

---

**Regulation des Virulenzgenregulators  
SlyA in pathogenen und apathogenen *Escherichia coli* Stämmen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Anna-Katharina Wagner  
aus Berlin

---

1. Referentin: Professor Dr. Petra Dersch  
2. Referent: Professor Dr. Michael Steinert  
eingereicht am: 13.09.2010  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 24.01.2011

Druckjahr 2011

**Für meine Eltern**

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Petra Dersch für die Bereitstellung des interessanten Themas, die gute Betreuung und die vielen wertvollen Ratschläge und Ideen.

Bei Prof. Dr. Michael Steinert möchte ich mich herzlich für die Übernahme des zweiten Gutachtens bedanken.

Vor allem danke ich auch Maurice Scheer für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Microarray-Daten und Manfred Rohde für die großartigen elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Natürlich danke ich auch besonders den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, die zu meiner Arbeit beigetragen haben, insbesondere Ann Katrin Heroven, Henriette Langhans, Katrin Benson, Wiebke Opitz und Katja Böhme und allen jetzigen und ehemaligen Laboranten der AG Dersch und AG Jahn für die schöne Zeit und die nette Arbeitsatmosphäre, für Anregungen, Motivation und konstruktive Kritik.

Für die großzügige Bereitstellung von Stämmen und Plasmiden danke ich Prof. Dr. Regine Hengge und Prof. Dr. Herbert Schmidt.

Meinem gutmütigen, liebevollen Partner danke ich für sein Verständnis, seine Geduld und gute Laune und für die vielen, vielen Botengänge, ohne die der Abschluss dieser Arbeit aus der Ferne nicht möglich gewesen wäre.



## Abkürzungsverzeichnis

µg	Microgramm
µl	Microliter
µM	Micromolar
µmol	Micromol
A	Adenin
Amp	Ampere
Abb.	Abbildung
ad	zu
ADP	Adenosindiphosphat
Ap	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chlor-indolylphosphat (= X-P)
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserum Albumin
C	Cytosin
ca.	circa
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
Cm	Chloramphenicol
CPI	Chloroform:Phenol:Isoamylalkohol
Da	Dalton
ddATP	Dideoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Dideoxycytidintriphosphat
ddGTP	Dideoxyguanosintriphosphat
ddTTP	Dideoxythymidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DYT	Double Yeast Tryptone
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii / aliae</i> (und andere)
EtOH	Ethanol
g	Gramm
G	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kn	Kanamycin
kb	Kilo-Basenpaar(e)
kDa	Kilo-Dalton
kV	Kilo-Volt

## Abkürzungsverzeichnis

---

I	Liter
LB	Luria-Bertani
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl-beta-Galactopyranosid
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	picomol
PNPP	p-Nitrophenylphosphat
Pr.	Primer
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
sog.	sogenannt/e/en/er
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	DNA-Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tc	Tetracyclin
TEMED	N,N,N,N,-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer RNA
U	Unit
V	Volt
W	Watt
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Die Produktion von CFA/I Pili durch ETEC .....	3
Abb. 1.2: Aggregation der bündelformenden Pili (BFP) durch EPEC.....	4
Abb. 1.3: Ausbildung von "pedestals" durch EPEC und EHEC Stämme.....	5
Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Interaktion von EPEC, EHEC, ETEC und EIEC mit einer Wirtszelle.....	9
Abb. 1.5: Die drei Aminosäure-Decarboxylase-Systeme zur Säurestressresistenz von <i>E. coli</i> .....	10
Abb. 1.6: Das regulatorische Netzwerk der Glutamat-vermittelten Säureresistenzgene in <i>E. coli</i> .....	11
Abb. 1.7: Kristallstruktur-Modelle einiger Vertreter der MarR/SlyA-Familie.....	20
Abb. 2.1: Oligonukleotid-Spezifitäten für die <i>E. coli</i> Stämme (Ocimum Biosolutions Manual).....	50
Abb. 3.1: Induktion der <i>clyA</i> '-' <i>lacZ</i> -Expression in <i>E. coli</i> K-12 MC4100, <i>E. coli</i> K-12 $\Delta$ <i>slyA</i> , <i>E. coli</i> K-12 <i>pslyA</i> <sup>+</sup> , EIEC 12860 und EPEC JPN15.....	62
Abb. 3.2: Phänotypischer Nachweis der Unterschiede in der SlyA-abhängigen ClyA-Synthese verschiedener <i>E. coli</i> Stämme.....	62
Abb. 3.3: Immunologischer Nachweis differentieller SlyA-Mengen in apathogenen und pathogenen <i>E. coli</i> Stämmen.....	63
Abb. 3.4: Stabilitäts-Analyse von Wildtyp SlyA-Protein in DH5 $\alpha$ Z1 abhängig von den Proteasen Lon und ClpP und in EIEC 12860 abhängig von der Temperatur .....	65
Abb. 3.5: Untersuchung der Expression des <i>slyA</i> -Promotors aus <i>E. coli</i> K-12 CC118 $\lambda$ pir, EIEC 12860 und EPEC JPN15 in <i>E. coli</i> K-12 .....	67
Abb. 3.6: Expression von <i>slyA</i> in Abhängigkeit des Stammhintergrundes.....	67
Abb. 3.7: Primer-Extension-Analyse des <i>slyA</i> -Gens aus <i>E. coli</i> K-12 MC4100 (1) bzw. EIEC 12860 (2).....	68
Abb. 3.8: Schematische Darstellung des Transkriptionsstartpunkts.....	69
Abb. 3.9: Positive Autoregulation der <i>slyA</i> -Expression in <i>E. coli</i> K-12 MC4100, EIEC 12860 und EPEC JPN15 .....	69
Abb. 3.10: Gelretardation des <i>slyA</i> -Promotors durch Bindung von SlyA .....	71
Abb. 3.11: DNaseI-Footprint-Analyse zur Lokalisation der SlyA-Bindung an die regulatorische Region von <i>slyA</i> .....	74
Abb. 3.12: Promotoraktivität der 5'-Deletionskonstrukte in Wildtyp und <i>slyA</i> - Mutante von <i>E. coli</i> K-12 MC4100 .....	76

Abb. 3.13: Promotoraktivität von $P_{slyA'_{K-12^-}}/lacZ$ und $P_{slyA'_{EIEC^-}}/lacZ$ in Wildtyp und <i>hns</i> -Mutante von <i>E. coli</i> K-12 MC4100 .....	78
Abb. 3.14: Promotoraktivität von $P_{slyA'_{K-12^-}}/lacZ$ und $P_{slyA'_{EIEC^-}}/lacZ$ in Wildtyp und <i>phoP/Q</i> -Mutante von <i>E. coli</i> K-12 BW25113 .....	79
Abb. 3.15: Analyse der <i>slyA</i> -Expression in einer <i>E. coli</i> <i>LrhA</i> -Mutante .....	80
Abb. 3.16: Derepression der <i>slyA</i> -Expression in <i>E. coli</i> K-12 MC4100 durch Deletion von <i>rpoS</i> .....	82
Abb. 3.17: Heterogene <i>RpoS</i> -Synthese in <i>E. coli</i> .....	84
Abb. 3.18: Analyse der <i>SlyA</i> -abhängigen <i>evgA</i> -Expression in <i>E. coli</i> .....	106
Abb. 3.19: Analyse der <i>SlyA</i> -abhängigen <i>gadA</i> -Expression in <i>E. coli</i> .....	107
Abb. 3.20: Gelretardation des <i>evgA</i> - und <i>gadA</i> -Promotors durch Bindung von <i>SlyA</i> .....	108
Abb. 3.21: Schwarm-Phänotypen von EHEC EDL933 wt, <i>slyA</i> <sup>-</sup> und <i>pslyA</i> <sup>+</sup> .....	109
Abb. 3.22: Gelretardation des <i>fliA</i> -Promotors durch Bindung von <i>SlyA</i> .....	110
Abb. 3.23: Die Überexpression von <i>slyA</i> in EPEC JPN15 bewirkt die Synthese extrem langer und vieler Flagellen .....	111
Abb. 3.24: Eine <i>slyA</i> -Mutante von EIEC 12860 exprimiert keine Flagellen .....	112
Abb. 3.25: Der Effekt von <i>SlyA</i> auf die Zellmorphologie von EIEC 12860 .....	112
Abb. 4.1: Schematische Darstellung der regulatorischen Region von <i>slyA</i> .....	116
Abb. 4.2: Schematische Darstellung der mittels DNaseI-Footprint-Analyse identifizierten <i>SlyA</i> -Bindestellen im $P_{slyA}$ .....	119
Abb. 4.3: Das regulatorische <i>SlyA</i> -Netzwerk in <i>E. coli</i> .....	134

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Chemikaliennachweis.....	23
Tab. 2.2: Verbrauchsmaterialnachweis.....	24
Tab. 2.3: Gerätenachweis.....	25
Tab. 2.4: Nachweis von DNA- und Proteinmarkern, Antikörpern und Enzymen.....	26
Tab. 2.5: Nachweis von Kits.....	27
Tab. 2.6: Wachstumsmedien für die Anzucht von <i>Escherichia coli</i> .....	28
Tab. 2.7: Antibiotika und weitere Medienzusätze .....	28
Tab. 2.8: Bakterienstämme.....	29
Tab. 2.9: Plasmide.....	31
Tab. 2.10: Oligonukleotide.....	33
Tab. 2.11: Verwendete Promotor- und Kontroll-Fragmente.....	42
Tab. 2.12: Oligonukleotide zur DNaseI-Footprint-Analyse .....	44
Tab. 3.1: Transkriptomvergleich von <i>E. coli</i> K-12 und <i>E. coli</i> K-12 <i>slyA</i> .....	86
Tab. 3.2: Transkriptomvergleich von <i>E. coli</i> K-12 und <i>E. coli</i> K-12 <i>pslyA</i> <sup>+</sup> .....	87
Tab. 3.3: funktionelle Klassen der in <i>E. coli</i> K-12 SlyA-regulierten Gene.....	91
Tab. 3.4: Transkriptomvergleich von EHEC O157:H7 und EHEC O157:H7 <i>slyA</i> .....	93
Tab. 3.5: Transkriptomvergleich von EHEC O157:H7 und EHEC O157:H7 <i>pslyA</i> <sup>+</sup> .....	94
Tab. 3.6: funktionelle Klassen der in EHEC O157:H7 SlyA-regulierten Gene.....	98
Tab. 3.7: potentielle SlyA-Bindemotive in SlyA-abhängigen Genen .....	103

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>II</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Enteropathogene Bakterien .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Verschiedene Pathotypen von <i>Escherichia coli</i> .....	1
1.1.1.1 ETEC .....	2
1.1.1.2 EPEC .....	4
1.1.1.3 EHEC .....	6
1.1.1.4 EIEC .....	8
<b>1.2 Die Glutamat- und Arginin-abhängigen Säureresistenz-Systeme         in <i>E. coli</i> .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3 Die Motilität von <i>E. coli</i> .....</b>	<b>12</b>
<b>1.4 Die Regulation von Stressadaptation und Virulenz in pathogenen         Bakterien .....</b>	<b>13</b>
1.4.1 Virulenzregulatoren .....	13
1.4.1.1 Der globale Transkriptionsregulator LrhA .....	14
1.4.1.2 Das Zwei-Komponenten Regulationssystem PhoP/Q .....	15
1.4.2 Globale Regulatoren .....	16
1.4.2.1 Der alternative Sigma-Faktor RpoS .....	16
1.4.2.2 Das Nukleoid-assoziierte Protein H-NS .....	17
1.4.2.3 Der globale Transkriptionsregulator SlyA .....	18
<b>1.5 Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>22</b>

<b>2. Material und Methoden</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>23</b>
2.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	23
2.1.2 DNA- und Proteinmarker, Antikörper und Enzyme	26
2.1.3 Verwendete Kits	27
2.1.4 Medien	27
2.1.4.1 Medien zur Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	27
2.1.5 Antibiotika und weitere Medienzusätze	28
2.1.6 Bakterienstämme und Plasmide	29
2.1.7 Oligonukleotide	33
<b>2.2 Mikrobiologische Methoden</b>	<b>34</b>
2.2.1 Wachstumsbedingungen	34
2.2.2 Sterilisation	34
2.2.3 Bestimmung der bakteriellen Zelldichte	35
2.2.4 Phänotypischer Nachweis der ClyA-Synthese	35
2.2.5 Motilitätsassay	35
<b>2.3 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>36</b>
2.3.1 DNA-Isolierung	36
2.3.2 Gelelektrophorese und -extraktion von DNA	36
2.3.3 Sequenzspezifische DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen	37
2.3.4 Dephosphorylierung	37
2.3.5 Ligation und Transformation	37
2.3.6 Polymerasekettenreaktion	37
2.3.7 Konstruktion von Deletionsmutanten	38
2.3.8 Konstruktion der Arabinose-induzierbaren Plasmide pAW1 – pAW8 und pAW32	39
2.3.9 DNA-Sequenzierung	39
<b>2.4 Analyse von DNA-Protein-Interaktionen</b>	<b>40</b>
2.4.1 Konstruktion des <i>slyA</i> -Überexpressionsplasmids	40
2.4.2 Überexpression und Reinigung des SlyA-Proteins	40
2.4.3 Native Gelretardationsexperimente	41
2.4.4 Nichtradioaktive DNase I-Footprint-Analyse	43
2.4.5 Herstellung von DIG-markierten Sequenzreaktionen	44
2.4.6 Kapillarblot zum DNA-Transfer	45
2.4.7 Detektion von DIG-markierter DNA	45

<b>2.5 Genexpressionsanalysen</b>	<b>46</b>
2.5.1 Beta-Galaktosidase Aktivitätstest	46
2.5.2 Konstruktion der Plasmid-kodierten Reporterfusionen pAW13, 15, 16 und pKAB5, 6, 7 und 8	47
2.5.3 Konstruktion der <i>slyA</i> '-Reporterfusionen im very-low copy Vektor pHSG575	48
2.5.4 Konstruktion der <i>gadA</i> '- und <i>evgA</i> '-Reporterfusionen im low-copy Vektor pGP20	48
2.5.5 Isolation von RNA	49
2.5.6 DNA-Chip-Analyse	49
2.5.6.1 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden	50
2.5.6.2 Hybridisierung	51
2.5.6.3 Scannen des DNA-Chips und Analyse der Daten	52
2.5.7 Primer-Extension	53
<b>2.6 Biochemische Methoden</b>	<b>53</b>
2.6.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	53
2.6.2 Immunoblotanalyse (Westernblot)	55
2.6.3 <i>In vivo</i> Stabilitätsanalyse von SlyA	56
2.6.4 Herstellung von SlyA-Antiserum	57
2.6.5 Reinigung des SlyA-Antiserums zur Reduzierung unspezifischer Bindungen	57
2.6.6 Dialyse des SlyA-Proteins	57
2.6.7 Bestimmung der Proteinkonzentration	58
<b>2.7 Elektronenmikroskopie</b>	<b>58</b>
<b>2.8 Computergestützte Analysen und Bildverarbeitung</b>	<b>59</b>
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>60</b>
<b>3.1 Synthese des globalen Regulators SlyA in pathogenen und apathogenen Virotypen von <i>Escherichia coli</i></b>	<b>60</b>
3.1.1 Die Menge des SlyA-Proteins unterscheidet sich in <i>E. coli</i> K-12 MC4100, EPEC JPN15, EIEC 12680 und EHEC EDL933	60
3.1.2 <i>in vivo</i> Analyse der SlyA Stabilität in EIEC 12860, <i>E. coli</i> K-12 DH5 $\alpha$ Z1, DH5 $\alpha$ Z1 <i>lon</i> und DH5 $\alpha$ Z1 <i>clp</i>	63



3.1.3 <i>slyA</i> -Expressions-Analyse in <i>E. coli</i> K-12 CC118 $\lambda$ pir, EIEC 12860 und EPEC JPN15 .....	66
<b>3.2 Relative Quantifizierung der SlyA-Transkripte aus <i>E. coli</i> K-12 MC4100 und EIEC 12860 und Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte mittels Primer-Extension-Analyse .....</b>	<b>68</b>
<b>3.3 Autoregulation von SlyA .....</b>	<b>69</b>
<b>3.4 Charakterisierung regulatorischer Elemente durch DNA/Protein-Interaktionsstudien .....</b>	<b>70</b>
3.4.1 Detektion von SlyA-Bindestellen in der <i>slyA</i> -Promotorregion durch Gelretardationsexperimente .....	70
3.4.2 Basengenaue Identifikation der SlyA-Bindestellen durch DNase I-Footprint-Analyse .....	72
3.4.3 Promotordeletionsanalyse von P <sub><i>slyA</i></sub> .....	75
<b>3.5 Regulatoren der <i>slyA</i>-Expression .....</b>	<b>77</b>
3.5.1 Einfluss des Nukleoid-assoziierten Proteins H-NS auf die <i>slyA</i> -Expression .....	77
3.5.2 Einfluss des Zwei-Komponenten-Systems PhoP/Q auf die <i>slyA</i> -Expression .....	78
3.5.3 Expressions- und Mutationsanalyse zum Einfluss des Transkriptionsregulators LrhA auf die <i>slyA</i> -Expression .....	79
3.5.4 Einfluss des alternativen Sigmafaktors RpoS auf die SlyA-Synthese .....	80
3.5.5 Die Heterogenität des RpoS-Spiegels in <i>E. coli</i> verursacht unterschiedliche <i>slyA</i> -Expressionsraten .....	82
<b>3.6. Definition des SlyA-Regulons .....</b>	<b>85</b>
3.6.1 Identifizierung putativer Mitglieder des SlyA-Regulons durch DNA-Chip Technologie .....	85
3.6.1.1 SlyA-regulierte Gene in <i>E. coli</i> K-12 .....	86
3.6.1.2 SlyA-regulierte Gene in EHEC O157:H7 .....	93
<b>3.7 SlyA-Induktion der Säureresistenz in <i>E. coli</i> .....</b>	<b>105</b>
3.7.1 SlyA induziert die Expression der Säureresistenz-Gene <i>adiC</i> , <i>evgA</i> und <i>gadA</i> .....	105
3.7.2 Detektion von SlyA-Bindestellen in der <i>evgA</i> -Promotorregion durch Gelretardationsexperimente .....	108

3.8. Der Einfluss von SlyA auf Motilität und Morphologie von <i>E. coli</i> .....	109
4. Diskussion.....	113
4.1 Analyse der SlyA-Synthese in pathogenen und apathogenen Virotypen von <i>E. coli</i> .....	113
4.2 Die Regulation von <i>slyA</i> .....	117
4.2.1 Autoregulation.....	117
4.2.2 Transregulatorische Faktoren.....	121
4.3 Das SlyA-Regulon.....	126
4.4 Induktion des Glutamat-abhängigen Säureresistenzsystems in <i>E. coli</i> .....	132
4.5 Der Einfluss von SlyA auf Motilität und Morphologie von <i>E. coli</i> .....	135
5. Zusammenfassung.....	138
6. Summary .....	140
7. Literatur .....	142
8. Lebenslauf.....	170

## 1. Einleitung

### 1.1 Enteropathogene Bakterien

Die *Enterobacteriaceae* sind eine große Familie von fakultativ anaeroben, Gram-negativen Stäbchen, die im Darmtrakt des Menschen und einiger Vertebraten leben. Zu ihnen gehört auch *Escherichia coli*, einer der vorherrschenden Mikroorganismen unter den Kommensalen der humanen physiologischen Darmflora (Nataro & Kaper, 1998). Während *E. coli* durch den Sauerstoff-Abbau im Dickdarm gewöhnlich einen wichtigen Beitrag zum Erhalt des anaeroben Milieus leistet, kann es bei einer Schwächung oder Immunsuppression des Wirtes als fakultativ pathogener Erreger Harnwegs-Infektionen auslösen.

#### 1.1.1 Verschiedene Pathotypen von *Escherichia coli*

Neben den fakultativ pathogenen Formen zählen auch obligat pathogene Keime zur Spezies *E. coli*. Im Gegensatz zu *Vibrio cholerae* und *Listeria monocytogenes*, die eine bestimmte Krankheit wie die Cholera bzw. die Listeriose auslösen, sind *E. coli* Stämme die Verursacher einer großen Vielfalt von Erkrankungen (Nataro & Kaper, 1998; reviewed in Rodriguez-Angeles, 2002), die drei verschiedenen Typen zugeordnet werden können: Harntraktinfektionen, neonatale Meningitis und Gastroenteritis.

Generell sind die verschiedenen durch *E. coli* ausgelösten Krankheiten mit unterschiedlichen Stämmen assoziiert, die dementsprechend über ein unterschiedliches Spektrum an Virulenzgenen verfügen. Ein Stamm verursacht meist nur eine Art von Erkrankung. Man teilt die Stämme nach ihrem "Serotyp" und nach ihrem "Virotyp" ein. Die serotypische Klassifizierung beruht auf der Reaktion von variablen Oberflächenmolekülen der Bakterien mit Antikörpern. Für die Klassifizierung werden die O-Antigene der Lipopolysaccharidschicht (LPS) und die H-Antigene der Flagellen herangezogen. Die O-Antigene bestimmen die Serogruppe, die H-Antigene den Serotyp (Nataro & Kaper, 1998; reviewed in Campos *et al.*, 2004). Der Virotyp wird durch das "attachment-Muster" an Wirtszellen, die Produktion von Toxinen und das Ausmaß der Invasion charakterisiert.

Bisher wurden sechs verschiedene Virotypen von darmpathogenen *E. coli* identifiziert:

- 1.) enterotoxische *E. coli* (ETEC)
- 2.) enteroaggregative *E. coli* (EAggEC)
- 3.) diffus adhärierende *E. coli* (DAEC)
- 4.) enteropathogene *E. coli* (EPEC)
- 5.) enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) und
- 6.) enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

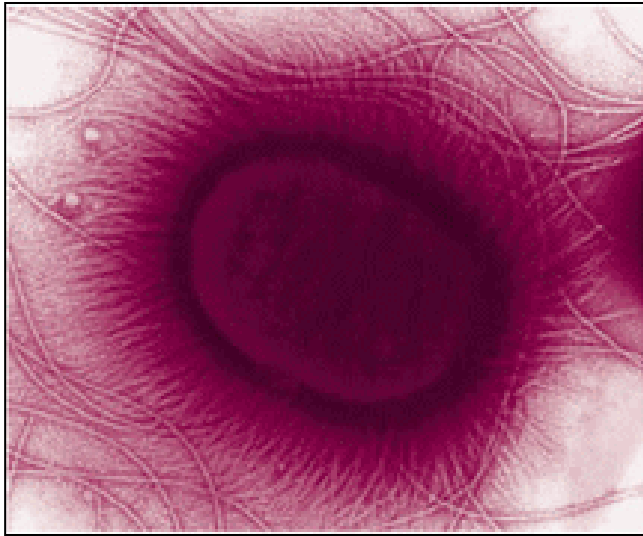
Diese Gruppen unterscheiden sich zwar hinsichtlich einzelner Virulenzmechanismen, bei ihrer Infektionsstrategie lassen sich jedoch Gemeinsamkeiten erkennen. Mit Hilfe spezieller Fimbrien können enteropathogene *E. coli* trotz der Darmperistaltik und der Nahrungskonkurrenz durch die physiologische Flora die intestinale Mukosa besiedeln. Ihnen gelingt sogar die Kolonisation des normalerweise nicht besiedelten Dünndarms (Nataro *et al.*, 1998; reviewed in Rodríguez-Angeles, 2002).

Das als "lokalisierte Adhärenz" bezeichnete Muster der Adhärenz ist typisch für ETEC, EHEC und EPEC-Stämme. Diese Stämme adhärieren an vereinzelt Stellen des befallenen Gewebes, wobei die bakterielle Schicht nur ein oder zwei Zellen dick ist. Bei EAggEC-Stämmen findet man dagegen die charakteristische "aggregative Adhärenz", bei der die Bakterien klumpige, mehrere Zellen dicke Aggregate bilden (Nataro *et al.*, 1998; Weintraub, 2007). Eine diffuse Verteilung von einzelnen Zellen, die sog. "diffuse Adhärenz" findet man dagegen bei DAEC-Stämmen (Scaletsky *et al.*, 1984; Servin, 2005; Le Bouguénec & Servin, 2006). An die Kolonisationsphase schließen sich die unterschiedlichen pathogenetischen Strategien der enteropathogenen *E. coli* an. Dabei sind drei Diarrhoe auslösende Modelle bekannt: 1. Enterotoxin-Produktion (ETEC und EAggEC), 2. Invasion (EIEC) und 3. Adhärenz an Intimin unter Verursachung sogenannter "*attaching and effacing*" Läsionen (EPEC und EHEC).

Der Mensch ist der Hauptwirt fast aller pathogener *E. coli* Stämme mit Ausnahme von EHEC, welcher vor allem in Rindern, aber auch im Darm von Hühnern, Schafen und Schweinen gefunden wird. Im Folgenden werden die Virotypen ETEC, EPEC, EIEC und EHEC ausführlicher behandelt, da sie in klinischer Hinsicht die wichtigste Rolle spielen.

### 1.1.1.1 ETEC

Die ETEC-Stämme sind Hauptverursacher der Reisediarrhoe (Black, 1990; reviewed in Gascon, 2006) und verantwortlich für mehr als die Hälfte aller Darmerkrankungen, die im Zusammenhang mit einem Aufenthalt in tropischen und subtropischen Ländern stehen (Nataro & Kaper, 1998). Außerdem sind sie ein wichtiger Verursacher von Diarrhoe bei Kindern. Der Erreger adhärert mit Hilfe von Spezies-spezifischen Fimbrien an Rezeptoren auf den Enterozyten des Dünndarms und ist nicht invasiv. In humanen Isolaten wurden die "colonization factor antigens" I und II (CFA/I, CFA/II) als fimbriale Adhäsine identifiziert (Blanco *et al.*, 1991; Gaastra & Svennerholm, 1996; Wolf, 1997; reviewed in Oyofe *et al.*, 2001).



**Abb. 1.1: Die Produktion von CFA/I Pili durch ETEC**

Die langen, geraden CFA/I Pili haben eine Länge von 5 – 7 nm und kontrastieren mit den längeren, dickeren und gewellten Flagellen (Kaper *et al.*, 2004).

Die Infektion erfolgt hauptsächlich über kontaminiertes Wasser und Lebensmittel (Black, 1990). Die infektiöse Dosis für ETEC liegt bei etwa  $10^8$  Zellen. Durch die Produktion von Toxinen, die an den Zellen der Mucosa wirken, wird eine Diarrhoe verursacht, die zwischen leichtem Unwohlsein und schweren, Cholera-artigen Symptomen variiert (Benenson, 1995). Da es sich um eine Toxin-vermittelte Erkrankung und keine systemische Infektion handelt, gibt es keine auffälligen histologischen Veränderungen in den Wirtszellen und die Diarrhoe verläuft unblutig und ohne Fieber. Die Krankheit ist in der Regel selbstlimitierend (Nataro & Kaper, 1998). Charakteristisch für diese Stämme ist ihre Fähigkeit, das LT ("hitzelabile") Enterotoxin und/oder das ST ("hitze stabile") Enterotoxin zu bilden (Benenson, 1995; Sears & Kaper, 1996). Das LT ist in Größe, Sequenz, Antigenität und Funktion dem Cholera-Toxin (CT) ähnlich und bindet an dieselben Gangliosid-Rezeptoren. Auch seine enzymatische Aktivität, die von der A-Untereinheit vermittelt wird, ist identisch zum CT. Die von fünf B-Untereinheiten umringte A-Untereinheit inaktiviert durch ADP-Ribosylierung ein GTP-Bindeprotein, das für die Kontrolle der cAMP-Produktion verantwortlich ist. Die Folge ist eine Veränderung des Elektrolyten-Gleichgewichts, wodurch es zum Wasserverlust der Gewebe und zur Entstehung von Diarrhoe kommt (Spangler, 1992; Sears & Kaper, 1996). Das ST ist kleiner als das LT und wird durch 30minütiges Sieden nicht inaktiviert. Mehrere ST-Varianten existieren, von denen ST1b und ST<sub>h</sub> nur in menschlichen Isolaten gefunden wurden, ST1a und ST<sub>p</sub> dagegen auch in tierischen. ST verursacht einen erhöhten cGMP-Spiegel im Cytoplasma der Wirtszelle, mit denselben Folgen die ein Anstieg des cAMP-Spiegels mit sich bringt (Goldstein *et al.*, 1994; Chao *et al.*, 1994, reviewed in Giannella & Mann, 2003).

### 1.1.1.2 EPEC

Enteropathogene *E. coli* (EPEC) verursachen einen wässrigen, manchmal blutigen Durchfall und sind Hauptverursacher der Säuglingsenteritis in Entwicklungsländern (Levine & Edelman, 1984, reviewed von Cravioto *et al.*, 1996). Die Symptome können Fieber, Erbrechen und abdominale Krämpfe einschließen (Levine & Edelman, 1984; Donnenberg *et al.*, 1993; Baldwin, 1998; Nataro & Kaper, 1998). Verunreinigtes Wasser und Fleischprodukte sind hauptsächliche Infektionsquellen, es treten aber auch nosokomiale Infektionen auf. Die infektiöse Dosis liegt bei  $10^6$  Zellen.

EPEC adhärirt in einem als "lokalisierte Adhärenz" (LA) bezeichneten Muster (Cravioto *et al.*, 1979; Scaletsky *et al.*, 1984; Knutton *et al.*, 1987; Vuopio-Varkila & Schoolnik, 1991) und unter Bildung von Mikrokolonien an die Enterozyten. Die Adhärenz wird in erster Linie über die bündelformenden Pili (BFP) vermittelt (Giron *et al.*, 1991; Cleary *et al.*, 2004), die durch das EAF-Plasmid kodiert werden („EPEC adhärenz factor“) (Donnenberg *et al.*, 1992). Aber auch EspA Fibern und Flagellen vermitteln die Adhäsion (Knutton *et al.*, 1998; Giron *et al.*, 2002; Cleary *et al.*, 2004).



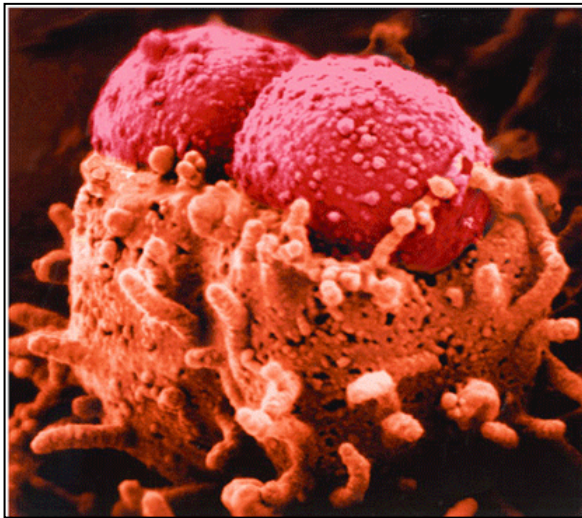
**Abb. 1.2: Aggregation der bündelformenden Pili (BFP) durch EPEC**

Die BFP von EPEC gehören zur Typ IV Pili Familie. Sie aggregieren unter Bildung von über 10 nm langen, Tau-ähnlichen Strukturen (Kaper *et al.*, 2004).

Die letzten Phasen der Adhäsion werden durch das Außenmembran-Protein Intimin („intimate EPEC adhäsın“) vermittelt, ein nicht-fimbriales Adhäsın. Über ein TypIII Sekretionssystem werden mehrere als Esp („EPEC secreted proteins“) bezeichnete Proteine sekretiert, von denen einige einen Kanal durch die innere und die äußere Membran des Bakteriums formen und eine Pore in der Membran der Wirtszelle bilden, wodurch die direkte Translokation von weiteren bakteriellen Virulenz-Proteinen (Effektoren) in die Wirtszelle ermöglicht wird (Knutton *et al.*, 1998, reviewed in Chen & Frankel, 2005). Eines der transportierten bakteriellen Proteine ist Tir („translocated intimin receptor“) (Kenny *et al.*,

1997, reviewed von Nougayrède *et al.*, 2003). Es wird in die Wirtszellmembran integriert und dient der festen Bindung des Bakteriums an die Zelloberfläche, indem es als Rezeptor für das bakterielle Adhäsin Intimin fungiert (Rosenshine *et al.*, 1996; Kenny *et al.*, 1997; Deibel *et al.*, 1998). Durch die Intimin-Tir Interaktion gelangen die Bakterien bis ca. 10 nm an die Plasmamembran der Zellen. Die Interaktion mit der Zellmembran hat dramatische Effekte auf die Ultrastruktur der Zelle und resultiert in einer Neuordnung des Aktin-Zytoskeletts. Gemeinsam führen diese Vorgänge zur Ausbildung der sog. A/E (attaching and effacing)-Läsionen (Knutton *et al.*, 1989; Moon, 1997; Celli *et al.*, 2000). Unmittelbar unter der Anheftungsstelle lösen sich die Mikrovilli auf, und es bilden sich becherförmig eingestülpte Sockel, die sog. „pedestals“, an denen die Bakterien haften (Knutton *et al.*, 1989; Goosney *et al.*, 1999; Campellone & Leong, 2003).

Da auch EHEC den Virulenz-Mechanismus der A/E-Läsion verwendet, gilt das Folgende zum Großteil auch für diesen Erreger, der die Läsionen im Gegensatz zu EPEC jedoch nicht im Dünndarm, sondern im Kolon ausbildet.



**Abb. 1.3: Ausbildung von "pedestals" durch EPEC und EHEC Stämme**

Die Histopathologie der A/E-Läsionen führt zur Bildung von sockelartigen Strukturen, den sog. "pedestals", die an der Adhäsionsstelle aus der Epithelzelle hervorstehen (Kaper *et al.*, 2004).

EPEC Stämme werden als „moderat-invasiv“ bezeichnet und verursachen eine Entzündungsreaktion. Die Diarrhoe wird vermutlich nicht durch die Produktion von Toxinen verursacht, denn bisher wurde kein von EPEC-Stämmen produziertes ST, LT oder Shiga-Toxin identifiziert (Donnenberg & Nataro, 1995; Kaper, 1996, reviewed von Tennant *et al.*, 2009). Vermutlich führen die Zerstörung der Mikrovilli mit dem damit einhergehenden Verlust von absorptiven Oberflächen (Kaper, 1998) und die aktive Sekretion von Cl<sup>-</sup> Ionen (Sears & Kaper, 1996) zum Verlust der großen Flüssigkeitsmengen und den anderen Symptomen.

Alle für die A/E-Läsionen benötigten Gene sind auf einer chromosomalen Pathogenitätsinsel genannt LEE (locus of enterocyte effacement) (McDaniel & Kaper, 1997) in funktionellen

Gruppen lokalisiert (Elliott *et al.*, 1998; Mellies *et al.*, 1999). Eine dieser Gruppen enthält die Gene für das TypIII Sekretionssystem, eine andere die für die sekretierten Proteine EspA, EspB und EspD und ihre vermuteten Chaperone, und eine weitere kodiert das Adhäsin Intimin und das Protein Tir (McDaniel *et al.*, 1995, McDaniel & Kaper, 1997). Die komplette Region ist 35 624 bp groß und hat einen niedrigen G + C-Gehalt (38,36 %), was dafür spricht, dass sie über horizontalen Gentransfer übertragen wurde (Elliot *et al.*, 1998).

Manche EPEC Typen werden aufgrund eines speziellen Adhäsions-Musters als DAEC („diffusely adherent *E. coli*“) bezeichnet. Sie sind ein wichtiger Verursacher von Reise-Diarrhoe in Mexiko und Nordafrika.

### 1.1.1.3 EHEC

Die enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) verursachen ebenso wie EPEC die charakteristischen A/E-Läsionen (Kaper *et al.*, 2004) und nutzen einen ähnlichen Infektionsmechanismus wie diese, können aber im Unterschied zu EPEC ein zum Shiga-Toxin (Stx) fast identisches Toxin produzieren (Paton & Paton, 1998). Sie sind daher eine Teilgruppe der Shiga-Toxin produzierenden *E. coli* (STEC). Prototyp und weltweit am häufigsten in Krankheiten involviert ist der Serotyp O157:H7.

Nach den Salmonellen sind EHEC zusammen mit *Campylobacter* zweithäufigster bakterieller Enteritiserreger in Deutschland (Karch *et al.*, 2000). Neben Kindern erkranken häufig auch ältere Menschen. EHEC sind äußerst resistent gegenüber Kälte, Austrocknung, Osmostress und saurem pH. Die Säurepersistenz bedingt die geringe Infektionsdosis von 10 bis 100 Keimen (Nataro & Kaper, 1998). Diese niedrige Infektionsdosis spielt neben der extremen Umweltresistenz eine wichtige Rolle bei der Übertragung, die hauptsächlich über kontaminierte Lebensmittel erfolgt, insbesondere über rohes Fleisch (Karch *et al.*, 1996).

EHEC ist Auslöser einer als hämorrhagische Kolitis (HC) bezeichneten Erkrankung, die durch blutige Durchfälle gekennzeichnet ist und sich zu einer potentiell tödlichen Komplikation, dem hämolytisch uremischen Syndrom (HUS), ausweiten kann. Dieses Syndrom beruht vor allem auf der Produktion des Shiga-ähnlichen Toxins (Karmali, 1989) und ist u.a. durch eine akute hämolytische Anämie und Nierenversagen gekennzeichnet (Gasser *et al.*, 1955).

Das Shiga-Toxin wurde vermutlich über Bakteriophagen von *Shigella dysenteriae* auf *E. coli* übertragen und begründete so den EHEC-Phänotyp (Jackson & Pratt, 1987; Gyles *et al.*, 1988; Weinstein *et al.*, 1988; Schmitt *et al.*, 1991). 1996 kam es zu einer Übereinkunft, früher als Verotoxine oder Shiga-like-Toxine bezeichnete Zytotoxine nach dem Shiga-Toxin von *Shigella dysenteriae* Typ 1 (Stx) zu benennen. Stx wirken als Zyto-, Entero- und Neurotoxine und spielen eine zentrale Rolle in der Entstehung und Progression der Krankheit.



Die Shiga-Toxine von EHEC werden in die zwei Hauptgruppen Stx1 und Stx2 unterteilt. Das hochkonservierte Stx1 unterscheidet sich von dem aus *Shigella dysenteriae* Typ1 nur durch eine einzige Aminosäure, während Stx2 und seine Varianten ca. 56% Homologie zu Stx1 aufweisen (O'Brien *et al.*, 1992).

Viele EHEC-Stämme produzieren bis zu drei Stx in unterschiedlichen Kombinationen. Epidemiologische Daten zeigen eine höhere Inzidenz von Hämorrhagischer Colitis oder HUS bei Erkrankung durch alleinige Stx2-Produzenten als durch Stämme, die nur Stx1 oder Stx1 und Stx2 zusammen produzieren (Ostroff *et al.*, 1989).

Shiga-Toxine besitzen eine AB<sub>5</sub>-Struktur. Nach Bindung an die Enterozyten wird das Stx freigesetzt und die enzymatisch-aktive A-Untereinheit vom restlichen Toxin abgespalten und ins Zytoplasma transloziert (Sandvig & van Deurs, 1992). Im Zytoplasma entfernt die freie A-Untereinheit, die eine N-Glycosidase ist, ein Adenin von der 28S rRNA (Saxena *et al.*, 1989) was zur Blockade der Proteinsynthese und schließlich zum Zelltod führt.

Die meisten für die AE-Läsionen verantwortlichen genetischen Elemente sowie weitere wichtige Virulenzfaktoren sind in der LEE-Region und auf dem großen Virulenzplasmid pO157 kodiert (Kaper *et al.*, 2004). Wenn die LEE-Region von EHEC in *E. coli* K-12 eingebracht wird, kann sie jedoch im Unterschied zu der aus EPEC den AE-Phänotyp nicht induzieren (McDaniel & Kaper, 1997; Elliott & Kaper, 1999). Vermutlich liegt der Grund dafür in einem nicht innerhalb von LEE kodierten Effektor-Molekül, dass für die volle Entwicklung der A/E-Läsion durch EHEC nötig ist (Campellone *et al.*, 2004; Garmendia *et al.*, 2004). Es gibt STEC Stämme, die keine LEE-Region kodieren, und trotzdem schwere Krankheiten inklusive des HUS im Menschen hervorrufen können (Paton & Paton, 1998). Dies spricht ebenfalls für die Existenz weiterer Virulenzfaktoren außerhalb von LEE.

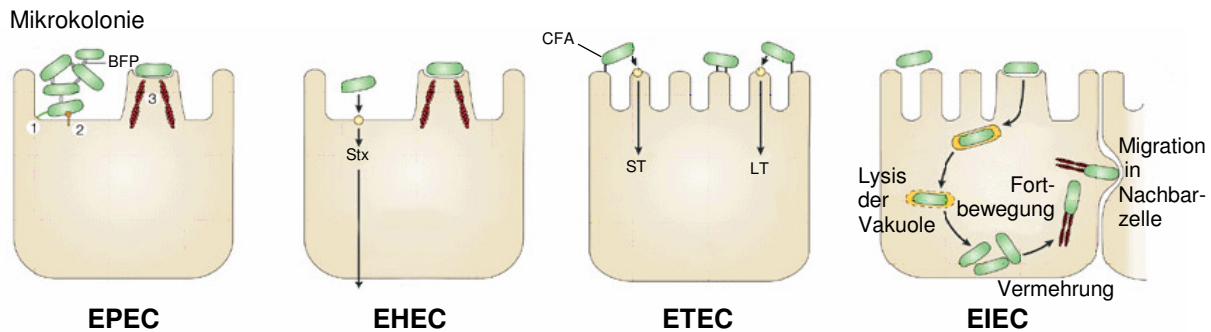
Wie EPEC sind EHEC Stämme „moderat invasiv“. Bei der Besiedlung des Wirtes spielt ebenfalls das Außenmembranprotein Intimin eine wichtige Rolle (Donnenberg *et al.*, 1993; McKee *et al.*, 1995) und EHEC Stämme, die kein Intimin exprimieren, lösen selten Humaninfektionen aus.

Bisher wurden mindestens 14 aufgrund von Sequenzvariationen separate Intimin-Subtypen beschrieben (Zhang *et al.*, 2002; Blanco *et al.*, 2004). Sie binden alle an dem translozierten Rezeptor Tir (Kenny *et al.*, 1997), aber verschiedene Subtypen können unterschiedliche Interaktionen mit eukaryotischen Zellen eingehen (Frankel *et al.*, 2001). So bindet Intimin- $\alpha$  wie auch das homologe Adhäsin Invasin von *Yersinia*-Spezies (Isberg & Leong, 1990; Jersey *et al.*, 1990), an  $\beta_1$ -Integrine (Frankel *et al.*, 1996), wobei diese Interaktion anscheinend für die Intimin-vermittelte Adhärenz von EPEC an humane Epithelzell-Kulturen nicht erforderlich ist (Liu *et al.*, 1999). Die Intimin-Subtypen, die von EHEC O157:H7, EPEC O127:H6 und *C. rodentium* exprimiert werden, binden an das eukaryotische Protein

Nucleolin (Sinclair & O'Brien, 2002). Nucleolin und Tir kompetitieren um dieselbe Intimin-Binderegion, wobei Tir eine 10fach höhere Affinität besitzt (Sinclair & O'Brien, 2004). Im Zellkulturmodell wurde die Lokalisation von Nucleolin um die Bindestelle beobachtet, während Tir unterhalb der adhärenenten Bakterien gefunden wurde (Sinclair & O'Brien, 2004).

### 1.1.1.4 EIEC

Ebenso wie die zu *E. coli* eng verwandten Shigellen sind die enteroinvasiven *E. coli* (EIEC) invasive Organismen. Sie ähneln *Shigella* sowohl im Pathogenitätsmechanismus als auch in den verursachten klinischen Symptomen (Menard *et al.*, 1996, Parsot & Sansonetti, 1996), produzieren jedoch im Gegensatz zu *Shigella* kein Shiga-Toxin und auch kein LT oder ST. EIEC penetrieren Epithelzellen des Kolons, wo sie sich vermehren. Dabei verursachen sie umfassende Zerstörungen der Zellen und lösen eine Entzündungsreaktion aus (Benenson, 1995). So ist die Pathogenität von EIEC vor allem ihrer Fähigkeit zuzuschreiben, in Enterozyten einzuwandern und eine Zerstörung der Mikrovilli und Nekrosen zu verursachen. Das klinische Krankheitsbild ist charakterisiert durch Auftreten von Blut im Stuhl, Durchfall, Fieber, Abdominalkrämpfe, Erbrechen und Muskelschmerzen (DuPont *et al.*, 1971). Die Krankheit ist im Regelfall selbstlimitierend. Es erkranken hauptsächlich Erwachsene, ein tierisches Reservoir von EIEC ist nicht bekannt. Die infektiöse Dosis liegt bei  $10^6$  Organismen. Die Infektion erfolgt über kontaminierte Lebensmittel, an erster Stelle über Trinkwasser, gefolgt von Salat und Weichkäse. Die Inkubationszeit liegt unter 24 Stunden. Die Pathogenität dieser enteroinvasiven Mikroorganismen ist ein komplexes Phänomen und erfordert die koordinierte Expression von mehreren Genen, die z. T. auf dem Chromosom und z. T. in einer 37 kb großen Region auf einem hochmolekularen, 140 MDa großen Plasmid kodiert sind (Harris *et al.*, 1982; Menard *et al.*, 1996; reviewed in Torres & Kaper, 2002). Dieses sogenannte "Invasiveness-Plasmid" (pINV) wird in identischer Weise von *Shigella* und EIEC produziert (reviewed in Parsot, 2005).



**Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Interaktion von EPEC, EHEC, ETEC und EIEC mit einer Wirtszelle**

EPEC adhären an Enterozyten des Dünndarms und zerstören die Mikrovilli-Struktur durch die Ausbildung der charakteristischen A/E-Läsionen. Mit den Rearrangements des Zytoskeletts gehen eine Entzündungsreaktion und Diarrhoe einher. EHEC induzieren ebenfalls A/E-Läsionen, jedoch im Kolon, und sekretieren zusätzlich *Shiga*-Toxin (Stx), das bei systemischer Absorption zu potentiell letalen Komplikationen führt. ETEC adhären an die Enterozyten des Dünndarms und induzieren durch Sekretion von hitzebeständigen (ST) und/oder hitzeempfindlichen (LT) Enterotoxinen eine wässrige Diarrhoe. EIEC invadieren die Epithelzellen des Kolons, lysieren die Phagosomen und bewegen sich durch die Zelle durch die Aggregation von Aktinfilamenten. BFP: Bündel-formender Pilus, CFA: Kolonisierungsfaktor Antigen, LT: hitzeempfindliches Enterotoxin, ST: hitzebeständiges Enterotoxin, Stx: *Shiga*-Toxin. (in Anlehnung an Kaper *et al.*, Nature Reviews Microbiology 2, 2004)

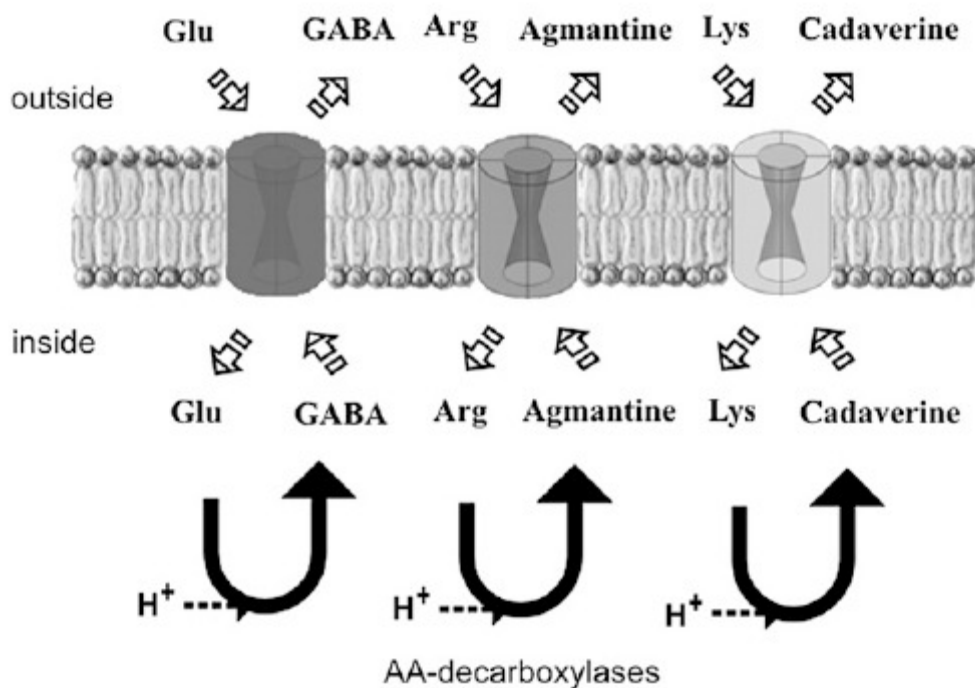
## 1.2 Die Glutamat- und Arginin-abhängigen Säureresistenz-Systeme in *E. coli*

Kommensale und pathogene *E. coli* Stämme bevorzugen das Wachstum bei neutralem pH, müssen jedoch für Kolonisierung und Pathogenese auch die extrem niedrigen pH-Werte (pH <3.0) bei der Passage des Magens für mehrere Stunden überstehen können (Small *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1995; 1996; Waterman & Small, 1998; Castanie-Cornet *et al.*, 1999; Audia *et al.*, 2001). Zu dieser außergewöhnlichen Säureresistenz tragen vier Systeme in der stationären Phase bei. Drei davon treten bei fermentativem Metabolismus auf und sind von Aminosäuren abhängig, eines von Glutamat, eines von Arginin, eines von Lysin. Das vierte System wird während oxidativem Wachstum exprimiert und ist Aminosäure-unabhängig (Castanie-Cornet *et al.*, 1999; Audia *et al.*, 2001).

Die beiden Glu- und Arg-abhängigen Systeme werden auch als XAR bezeichnet („extreme acid resistance“), da sie 1. das Überleben für mehr als eine Stunde bei 37°C und einem pH-Wert unter 3 erlauben, 2. Wachstum unter fermentativen Bedingungen in Vollmedium vor dem Säureschock zur Bedingung haben, 3. keines Adaptationsschrittes bei mäßig-saurem pH bedürfen und 4. während des Säurestress auf das Vorhandensein spezieller Aminosäuren angewiesen sind (Lin *et al.*, 1995; 1996; Castanie-Cornet *et al.*, 1999;). Das Lysin-abhängige System, das die induzierbare Lysin-Decarboxylase CadA involviert, bietet einen milderen Schutz (Iyer *et al.*, 2003).

Den drei Systemen gemeinsam ist die Decarboxylierung von Aminosäuren im Cytoplasma als chemische Reaktion, bei der Protonen verbraucht werden, um der lebensbedrohlichen

Übersäuerung des intrazellulären Milieus entgegenzuwirken. Bei dem Glutamat-abhängigen System produzieren die beiden Glutamat-Decarboxylase Isozyme GadA und GadB  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), die von dem Antiporter GadC im Austausch gegen Glutamat exportiert wird (Smith *et al.*, 1992; Hersh *et al.*, 1996; Castanie-Cornet *et al.*, 1999; De Biase *et al.*, 1999; Richard & Foster 2003). Das Arginin-abhängige System besteht aus der Säure-induzierbaren Arginin-Decarboxylase AdiA und dem Antiporter AdiC, der das Produkt der AdiA, Agmatin, gegen extrazelluläres Arginin austauscht (Stim & Bennett, 1993; Lin *et al.*, 1995; 1996; Castanie-Cornet *et al.*, 1999; Gong *et al.*, 2003; Iyer *et al.*, 2003;). Lysin wird von CadA zu Cadaverin umgesetzt und von CadB ins Medium transportiert (Park *et al.*, 1996). Das Glutamat-abhängige ist das durch seine Effizienz und komplexe Regulation bemerkenswerteste dieser Systeme (Castanie-Cornet *et al.*, 1999; Iyer *et al.*, 2003).



**Abb. 1.5: Die drei Aminosäure-Decarboxylase-Systeme zur Säurestressresistenz von *E. coli***

Die Abbildung stammt aus Prosseda *et al.*, 2007.

Der LuxR-ähnliche Regulator GadE ist der zentrale Aktivator der *gadA*- und *gadBC*-Expression (Hommais, *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2003; 2004) und unabhängig von Medium oder Wachstumsbedingungen essentiell für deren Genexpression. Die zwei AraC-artigen Regulatoren GadX und GadW werden dagegen nur für die Expression von *gadA/BC* unter besonderen Bedingungen benötigt (Shin *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2003). Diese Regulatoren aktivieren *gadE* während des Wachstums in komplexem Medium, können aber *gadA* und *gadBC* auch direkt reprimieren. GadX, GadW und der alternative Sigma-Faktor RpoS bilden eine regulatorische Schleife, die von cAMP und CRP beeinflusst wird (Small *et al.*, 1994; Ma,

*et al.*, 2002; 2003; Tramonti *et al.*, 2002). Dieser Weg ist in komplexem Medium besonders wichtig, während beim exponentiellen Wachstum in Minimalmedium bei leicht saurem pH (5.5) *gadE* über den alternativen Weg EvgA-YdeO-GadE aktiviert wird. EvgA aktiviert *gadE* dabei sowohl direkt als auch über die Induktion von *ydeO* (Masuda & Church, 2003; Hommais *et al.*, 2004). GadE ist positiv autoregulierte und reprimiert in einer Feedback-Schleife die Expression von *ydeO* (Ma *et al.*, 2004).

Der Response-Regulator EvgA ist ein Mitglied des Zwei-Komponenten-Systems EvgS/EvgA. Er wirkt als Transkriptionsaktivator von Genen, die Resistenz gegenüber Säure und Medikamenten sowie die Anpassung an osmotische Veränderungen vermitteln (Nishino *et al.*, 2003). Nach der Autophosphorylierung der Sensor-Kinase-Phosphotransferase EvgS wird die Phosphoryl-Gruppe auf den Transkriptionsaktivator EvgA transferiert. Das somit aktivierte EvgA induziert die Transkription von mindestens 37 Genen, darunter *ydeO*, *gadA/BC*, *hdeAB* (Masuda 2002), *gadE* (Ma *et al.*, 2004), *ompC* (Utsumi *et al.*, 1992; 1994), *emrKY* (Kato *et al.*, 2000; Nishino, 2001), *yhiUV*, *acrAB*, *mdfA*, *tolC* (Eguchi *et al.*, 2003) und weitere Gene (Masuda & Church, 2002; 2003; Nishino *et al.*, 2003). *evgAS* wird selbst durch EvgA positiv autoregulierte. H-NS ist durch Repression von *evgA* und *gadX* in die Glutamat-abhängige Säureresistenz von *E. coli* involvierte.

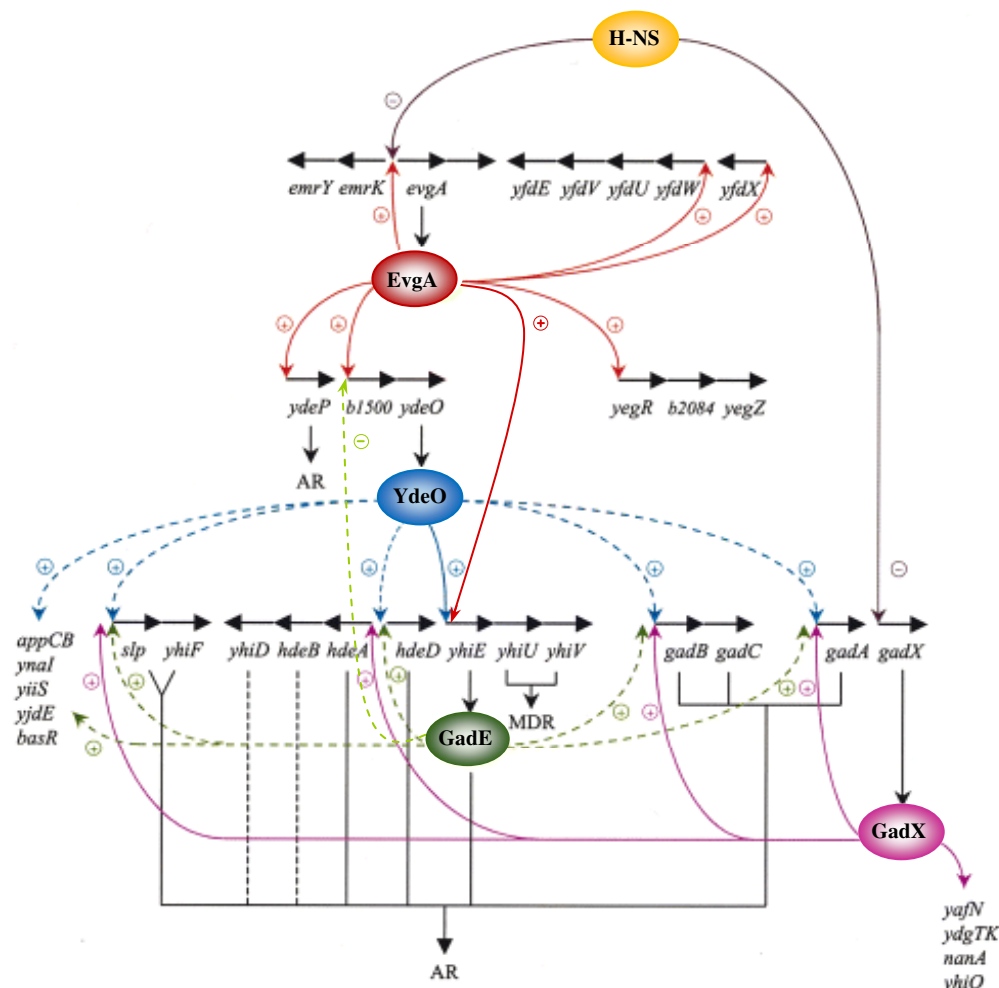


Abb. 1.6: Das regulatorische Netzwerk der Glutamat-vermittelten Säureresistenzgene in *E. coli*

Die Abbildung entstand in Anlehnung an „Nobuhisa Masuda, George M. Church (2003) Regulatory network of acid resistance genes in *Escherichia coli*“, Molecular Microbiology, und „Zhuo Ma, Nobuhisa Masuda and John W. Foster (2004) Characterization of EvgAS-YdeO-GadE Branched Regulatory Circuit Governing Glutamate-Dependent Acid resistance in *Escherichia coli*“. Die von YdeO regulierten Genprodukte Slp-YhiF, HdeA, HdeD, YhiE und GadABC induzieren kooperativ die Säureresistenz (AR) in *E. coli*. YhiUV induzieren multiple Medikamenten-Resistenz (MDR). GadX und YhiE (GadE) aktivieren einige der durch YdeO aktivierten Gene.

### 1.3 Die Motilität von *E. coli*

Die Produktion von Flagellen und die daraus resultierende Motilität bilden einen signifikanten Zugang zu Ressourcen für Mikroorganismen. Die Fähigkeit, eine Nahrungsquelle vor Wettbewerbern zu erreichen oder sich von Substanzen zu entfernen, die sich nachteilig auf den Stoffwechsel auswirken, birgt einen entscheidenden Überlebensvorteil. Die Prägnanz dieser Fähigkeit bedingt ihre strenge Kontrolle und Regulation. Das *flhDC*-Regulon kodiert eine große Anzahl von strukturellen, biosynthetischen und regulatorischen Genen für Flagellen, Motilität und Chemotaxis. Es besteht aus mindestens 17 Operons mit über 50 Genen, die in einem temporär regulierten, hierarchisch gegliederten dreistufigen System kontrolliert werden (Chilcott & Hughes, 2000; Kalir *et al.*, 2001; reviewed in Aldridge & Hughes, 2002 und Chevance & Hughes, 2008;). An höchster Stelle steht das *flhDC*-Operon (Klasse I Gene), das den positiven Hauptregulator FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> kodiert. Dieses Heterotetramer kontrolliert die Expression der übrigen Gene des Regulons entweder direkt (Klasse II Gene) oder indirekt (Klasse III Gene) (Liu & Matsumura, 1994, Prüss 2000; Prüss *et al.*, 2001). Die indirekte Aktivierung hängt über den FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub>-aktivierten Sigmafaktor FliA ( $\sigma^{28}$ ) von der FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> Funktion ab (Prüss, 2000). Die Klasse II Gene kodieren Proteine für Basalkörper und Haken des Flagellums und den Sigmafaktor FliA. Die Klasse III Gene werden für den Zusammenbau des Flagellenfilamentes, die Motoraktivität und die Chemotaxis benötigt und kodieren den Anti- $\sigma^{28}$  Faktor FlgM. Dieser fungiert als negativer Transkriptionsregulator von  $\sigma^{28}$  (Komeda, 1986; Ohnishi *et al.*, 1990; Gillen & Hughes, 1991). Das FlgM-Protein nimmt den Entwicklungsstatus des Flagellums wahr, indem es selbst ein Substrat für die Sekretion durch die Flagellum-spezifische TypIII-Sekretion ist (Hughes *et al.*, 1993; Kutsukake & Iino 1994). Durch die fortlaufende FlgM-Sekretion sinkt seine zelluläre Konzentration und es kommt zu einer Derepression der  $\sigma^{28}$ -vermittelten Expression der Klasse III Transkripte (Karlinsky *et al.*, 2000; Barembruch & Hengge, 2007). Über den FlgM-Spiegel wird somit der Status des Flagellenaufbaus mit der Regulation der  $\sigma^{28}$ -abhängigen Transkription gekoppelt und der Aufbau erfolgt sequentiell von den inneren zu den äußeren Strukturen (reviewed in Apel & Surette, 2008).

## 1.4 Die Regulation von Stressadaptation und Virulenz in pathogenen Bakterien

Da der Einsatz von Virulenz-Mechanismen viel Energie benötigt, wird er streng und nach ökonomischen Gesichtspunkten kontrolliert. Die meisten enteropathogenen Bakterien alternieren zwischen wirtsinternen und -externen Habitaten. Deshalb werden akzessorische Virulenzfaktoren, die generell wenig Nutzen für ein Bakterium außerhalb des Wirtes haben, wie Toxine, Adhäsine, Invasine, Kapseln, Eisenaufnahmesysteme und Außenmembranproteine, erst beim Eintritt in den Wirt gebildet. Nicht-adäquate Gene werden reprimiert. Viele physikalische (Temperatur, pH, Osmolarität, Sauerstoffgehalt) und chemische (Ionen, Nahrungsangebot, toxische Substanzen) Parameter variieren zwischen wirtsinternen und -externen Habitaten. Diese fungieren daher als Signal für die bakterielle Wahrnehmung der Umgebung und beeinflussen die schnelle Optimierung des Expressionsprofils von Stress- wie auch von Virulenzgenen (Gross, 1993). Daher existieren viele Überlappungen zwischen spezifischen und generellen Stressantworten in pathogenen Enterobacteriaceen, die durch oxidativen Stress, Hitzeschock, Nahrungsmangel, hohe Zelldichte, Säurestress und Eisenmangel induziert werden. Eine Veränderung der Genexpression von Stress- und Virulenzfaktoren beruht in der Regel auf mehreren Mechanismen:

- a.) Veränderung in der DNA-Topologie durch verschiedene Umweltreize wie z. B. Temperaturerhöhung. Dabei verändert sich die Exposition von Bindestellen für Regulatorproteine, woraus eine reduzierte oder erhöhte Transkriptionsrate resultiert.
- b.) Aktivierung oder Expression von Regulatorproteinen, die die Expression von Virulenzgenen direkt oder indirekt induzieren oder reprimieren.
- c.) Regulation der Genexpression durch sog. Zwei-Komponenten-Systeme wie z. B. das PhoP/Q Regulationssystem.
- d.) Aktivierung bzw. Inaktivierung von globalen Stressregulatoren, wie z. B. des alternativen Sigma-Faktors RpoS und des Nukleoid-assoziierten Proteins H-NS.

### 1.4.1 Virulenzregulatoren

Die unter 1.4.b beschriebenen Virulenzregulatoren gehören häufig zu Familien, die nach einem prototypischen Mitglied benannt wurden. Besondere Bedeutung haben dabei die Aktivatoren der AraC und der LysR Familie. Die AraC-ähnlichen Regulatoren stellen die größte Aktivatorfamilie dar und sind in die Produktion von vielen verschiedenen Virulenzgenen im Rahmen von Infektionen bei Tieren und Pflanzen involviert, die auf unterschiedliche Umweltsignale hin ausgeprägt werden (Gallegos *et al.*, 1997, reviewed in Martin & Rosner, 2001). Aktivatoren der AraC Familie enthalten ein typisches Helix-Turn-

Helix Motiv in ihrer konservierten C-terminalen Domäne. Dieses bindet an spezifische Operatorsequenzen der Promotoren von regulierten Genen, die stromaufwärts vor der -35 Region liegen oder mit ihr überlappen. AraC-ähnliche Aktivatoren induzieren die Gen-Expression gewöhnlich über DNA-biegende und schlaufenbildende Mechanismen. Oft wirken sie mit den Histon-ähnlichen Proteinen zusammen.

Eine andere Regulatoren-Gruppe ist die LysR Familie. Ihre Mitglieder haben sehr unterschiedliche Funktionen und sind meist an der Kontrolle von vielen stressassoziierten Virulenzfaktoren beteiligt. LysR-ähnliche Regulatoren sind in der Regel negativ autoreguliert (Schell, 1993) und Vertreter dieser Familie agieren meist als Repressoren der Virulenzgenexpression (Klauck *et al.*, 1997; Deghmane *et al.*, 2000). Eine Ausnahme bildet der LysR-Typ Regulator LrhA von *E. coli*, der positiv autoreguliert ist (Lehnen *et al.*, 2002). Er wird im nächsten Abschnitt ausführlich beschrieben.

### 1.4.1.1 Der globale Transkriptionsregulator LrhA

Der LysR-Typ Regulator LrhA (LysR homologue A) von *E. coli* kontrolliert die Transkription von Flagellen-, Motilitäts- und Chemotaxisgenen (Bongaerts *et al.*, 1995; Lehnen *et al.*, 2002). Eine *lrhA*-Mutante zeigt eine erhöhte Expression von Flagellen-, Motilitäts- und Chemotaxis-Genen (z. B. *flhDC*, *fliA* und *fliC*) und eine damit einhergehende gesteigerte Motilität und Chemotaxis. Dieser Effekt geht auf die LrhA-vermittelte Repression des Hauptregulators der Flagellen-Biosynthese, FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub>, und somit des gesamten *flhDC*-Regulons zurück (Lehnen *et al.*, 2002). Außerdem reprimiert LrhA Gene mit regulatorischer (*fimE*) oder struktureller (*fimAICDFG*) Funktion bei der Typ 1 Fimbrien-Synthese. Die Wirkung von LrhA ist spezifisch für Typ 1 Fimbrien und weder S noch P Fimbrien in UPEC werden durch LrhA beeinflusst (Blumer *et al.*, 2005). Durch den Effekt auf die Flagellen- und Fimbrien-Synthese beeinflusst LrhA auch die Entwicklung von Biofilmen und die Adhärenz an eukaryotische Zellen (Lehnen *et al.*, 2002; Blumer *et al.*, 2005).

LrhA reprimiert die Expression von mehreren anderen globalen Regulatoren, dazu gehört der alternative Sigma-Faktor RpoS (Gibson & Silhavy, 1999). In *E. coli* senkt LrhA den RpoS Spiegel und verhindert so die Akkumulation dieses Sigmafaktors und die Transkription von hunderten von Stationärphasen-Genen (Gibson & Silhavy, 1999).



### 1.4.1.2 Das Zwei-Komponenten Regulationssystem PhoP/Q

Das Überleben von Zellen in einer sich laufend verändernden Umgebung erfordert ständige Anpassung. Das wichtigste System zur Wahrnehmung von solchem Umweltstress in Bakterien ist das Zwei-Komponenten-Signaltransduktions-System. Dieses System transduziert Information in die Zelle, um so deren Anpassung zu ermöglichen. Es besteht grundlegend aus zwei Proteinen, die miteinander interagieren: einem Histidin-Kinase-Sensor in der inneren Membran und einem Response-Regulator im Zytoplasma. Die typische Histidin-Kinase ist ein Transmembranprotein mit einer N-terminalen extrazellulären Sensordomäne und einer C-terminalen zytoplasmatischen Kinase-Transmitterdomäne. Die Aktivität der zytoplasmatischen katalytischen Domäne wird durch ein Signal moduliert, das durch die Membran von der Sensordomäne transduziert wird. In seinem aktiven Zustand phosphoryliert der Histidin-Kinase-Sensor einen konservierten Histidinrest in der zytoplasmatischen Domäne. Die Phosphorylgruppe wird von der Histidin-Kinase auf einen konservierten Aspartatrest in der N-terminalen Empfänger-Domäne des Response-Regulators übertragen (Dutta *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 2000). Die Phosphorylierung der Empfänger-Domäne aktiviert die C-terminale Effektor-Domäne, welche die adaptive Antwort durch Modulation der Transkription oder durch Flagellenrotation vermittelt.

Bei der Analyse des *E. coli* Genoms wurden insgesamt 29 Histidin-Kinase-Sensoren, 32 Response-Regulatoren und ein HPt („histidine-containing phosphotransmitter“) entdeckt (Mizuno, 1997). Jeder Sensor reagiert dabei auf individuelle Stressarten. Ein wichtiges und intensiv untersuchtes Beispiel ist das Signalsystem, das von der Sensor-Kinase PhoQ und dem Response-Regulator PhoP kontrolliert wird. Neben *E. coli* existiert es auch in *Salmonella* und verwandten Bakterien und reguliert dort die Expression einer großen Menge an Genen (Groisman, 2001; Minagawa *et al.*, 2003; Zwir *et al.*, 2005; Monsieurs *et al.*, 2005). Es wird durch Signale wie niedrige  $Mg^{2+}$  Konzentration (Vescovi *et al.*, 1996), niedrigen pH (Prost *et al.*, 2007) oder bestimmte antimikrobielle Peptide (Bader *et al.*, 2005) aktiviert und induziert Gene, die  $Mg^{2+}$ -Transporter kodieren, die Zellhülle modifizieren und Resistenz gegenüber kationischen antimikrobiellen Peptiden verleihen (Fields *et al.*, 1989; Gunn & Miller 1996, Guo *et al.*, 1998; Guina *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2004) sowie Säurestressenzyme (Alpuche Aranda *et al.*, 1992; Bearson *et al.*, 1998; Zwir *et al.*, 2005) und andere Faktoren, die die Virulenz regulieren (Kato & Groisman, 2008; Prost *et al.*, 2007; Beier & Gross, 2006; Brodsky & Gunn, 2005).

Eins der durch PhoP regulierten Gene in *Salmonella* ist *slyA*, das unter niedrigen  $Mg^{2+}$ -Bedingungen von PhoP durch direkte Bindung an eine stromaufwärts gelegene Promotorregion aktiviert wird (Norte *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2004). Gemeinsam aktivieren SlyA und PhoP die Transkription der horizontal erworbenen Gene, wobei beiden eine unterschiedliche Funktion zukommt. Während PhoP für die Aktivierung der Promotoren der

fremden Gene verantwortlich ist, wirkt SlyA der durch H-NS vermittelten Repression dieser Gene entgegen (Perez & Groisman, 2008). In Kapitel 1.4.2.3 wird der Transkriptionsregulator SlyA im Detail vorgestellt.

### 1.4.2 Globale Regulatoren

#### 1.4.2.1 Der alternative Sigma-Faktor RpoS

Mehrere pathogene Bakterien benutzen alternative Sigma-Faktoren, um die Transkription von großen Virulenzgen-Gruppen über eine Veränderung der Spezifität der RNA-Polymerase (RNAP) für deren Promotoren zu kontrollieren (Ishihama, 2000; reviewed in Mooney *et al.*, 2005). Die Promotorpräferenz der RNAP kann durch Bindung eines allosterischen Effektors wie ppGpp verändert werden oder durch den Ersatz des gewöhnlichen  $\sigma$ -Faktors  $\sigma^{70}$  durch einen spezifischen Stress- $\sigma$ -Faktor. Ein signifikantes Beispiel für solch einen alternativen Sigma-Faktor ist  $\sigma^S$  (RpoS), der beim Eintritt in die stationäre Phase und als Antwort auf viele umweltbedingte Stresssituationen induziert wird (Loewen *et al.*, 1998; Hengge-Aronis, 2000; reviewed in Hengge, 2008). Aufgrund seiner bedeutenden Funktion in der stationären Phase und bei der Antwort auf eine Vielzahl unterschiedlicher Stresstypen, wie sie bei Eintritt in den Wirt häufig auftreten, gilt RpoS als Hauptregulator der sog. generellen Stressantwort. Diese Form der Stressantwort verleiht den Zellen eine umfangreiche Resistenz und schützt sie so vor Schäden unterschiedlichster Ursache. Dementsprechend gehören zum RpoS-Regulon hauptsächlich Gene zum Schutz vor oxidativem Stress, UV-, Hitze-, Osmo- und Säurestress (Lange & Hengge-Aronis, 1991; McCann *et al.*, 1991; Hengge-Aronis *et al.*, 1993), aber auch Gene, die die Morphologie und den Metabolismus beeinflussen (Bishop *et al.*, 1998) sowie eine Anzahl von Virulenzgenen in pathogenen Bakterien.

In *E. coli* werden mehrere Virulenzgene durch  $\sigma^S$  induziert, wie z. B. die von *katE* kodierte HP11 Katalase (Loewen & Triggs, 1984; Sak *et al.*, 1989), die  $H_2O_2$ -Resistenz vermittelt.

*S. typhimurium* Stämme mit einer *rpoS*-Deletion sind deutlich in ihrer Virulenz reduziert. Sie sind zudem sensibler gegenüber Hunger,  $H_2O_2$ , Säure-, Osmo- und oxidativem Stress und Schäden an der DNA. Generell handelt es sich bei all diesen Stressformen um Bedingungen, denen die Bakterien besonders nach der Phagocytose durch Makrophagen ausgesetzt sind (Hengge-Aronis, 2000; reviewed in Hengge, 2008).

#### 1.4.2.2 Das Nukleoid-assoziierte Protein H-NS

Die DNA von enterischen Bakterien wird von Nukleoid-assoziierten Proteinen organisiert und komprimiert, von denen H-NS ("histone-like nucleoid structuring protein") einer der Hauptvertreter ist (Williams & Rimsky, 1997; Dorman *et al.*, 1999; reviewed in Fang & Rimsky, 2008 und in Stoebe *et al.*, 2008). Es ist an der Bildung der Schleifen-Domänen beteiligt, die einen wichtigen Teil der höheren Organisation des bakteriellen Chromosoms darstellen (Noom *et al.*, 2007). Zusätzlich zur Rolle bei der Verpackung der DNA übt H-NS eine transkriptionelle Kontrolle auf eine Vielzahl von Genen als Antwort auf unterschiedliche Stimuli der Umgebung aus (Grainger *et al.*, 2006; Lucchini *et al.*, 2006; Navarre *et al.*, 2006, 2007; Oshima *et al.*, 2006; Wade *et al.*, 2007; reviewed in Fang & Rimsky, 2008).

H-NS kommt nur bei Gram-negativen Bakterien vor, ist dort allerdings weit verbreitet und bindet bevorzugt an AT-reiche, doppelsträngige und intrinsisch gebogene DNA-Bereiche, wie sie häufig in Promotorregionen zu finden sind (Atlung & Ingmer, 1997; Dame *et al.*, 2001; Schroder & Wagner 2002; Dorman 2004; Prosseda *et al.*, 2004). Aus dieser relativ unspezifischen Bindeeigenschaft erklärt sich das große Regulon von H-NS. Allerdings wurde eine DNA-Sequenz identifiziert, an die H-NS mit höherer Affinität als an andere AT-reiche Elemente bindet: 5'-TCGATATATT-3' (Lang *et al.*, 2007). Annähernd 5% der *E. coli* K-12 Gene stehen unter der Kontrolle dieses Proteins, davon sind viele in die Stressresistenz involviert (Laurent-Winter, *et al.*, 1997; Williams & Rimsky, 1997; Dorman *et al.*, 1999; Hommais *et al.*, 2001). H-NS wurde als transkriptioneller Stilleger ("silencer") beschrieben, wobei es tatsächlich hauptsächlich als negativer Regulator agiert (Spassky *et al.*, 1984; Ueguchi & Mizuno, 1993; Falconi, *et al.*, 1993; 1998; Afflerbach *et al.*, 1999; Dorman, 2007). Die Expression von Virulenzgenen wird meist bei einer nicht-permissiven Wachstumstemperatur unter 30°C reprimiert und bei permissiver Temperatur (37°C) aktiviert, wobei häufig H-NS beteiligt ist (Cornelis, 1993; Atlung & Ingmer 1997; Bustamante *et al.*, 2001; Rimsky *et al.*, 2001; Badaut *et al.*, 2002; Dame *et al.*, 2002). Der negativen Regulation durch H-NS wird oft durch Aktivatorproteine der AraC Familie entgegengewirkt. Außerdem werden die durch H-NS reprimierten Virulenzgene durch eine Veränderung der DNA Topologie aktiviert, die von mehreren Umweltfaktoren induziert wird, häufig von der Temperatur, der Osmolarität, dem pH und dem Sauerstoffspiegel (Rohde *et al.*, 1994; Atlung & Ingmer 1997).

H-NS ist mit 136 Aminosäuren ein kleines Protein mit DNA- und RNA-Bindungsaktivität (Brescia *et al.*, 2004), das aus zwei funktionell verschiedenen Domänen besteht: eine N-terminale Domäne, die in die Oligomerisation involviert ist, und eine C-terminale DNA-Binde-Domäne. Beide sind über eine kurze und flexible Region miteinander verbunden (Ueguchi & Mizuno, 1996; Ueguchi *et al.*, 1997; Dorman *et al.*, 1999; Smyth *et al.*, 2000; Badaut *et al.*,

2002). H-NS formt in Lösung Dimere durch eine "coiled-coil" Interaktion (Esposito *et al.*, 2002), die die Fähigkeit haben, DNA-Protein-DNA-Brücken auszubilden sowohl zwischen separaten DNA-Molekülen als auch zwischen verschiedenen Teilen desselben DNA-Moleküls (Dame *et al.*, 2005, 2006; Dorman, 2007 a; Noom *et al.*, 2007). Diese Dimere sind in konzentrationsabhängiger Weise zu einer Selbst-Assoziation befähigt (Falconi *et al.*, 1988; Ueguchi & Mizuno, 1996; Spurio *et al.*, 1997; Ceschini *et al.*, 2000), so dass ein oligomerer Status erreicht wird (Smyth *et al.*, 2000), der mit einer weniger spezifischen Bindung einhergeht. Diese oligomere Struktur basiert auf einer "head-to-tail" Interaktion der Dimere (Esposito *et al.*, 2002). Diese langen Nukleoproteinkomplexe können ganze Promotorregionen einschließen (Dame *et al.*, 2001). Die Fähigkeit von H-NS zu dimerisieren und dann selbst-assoziierte Oligomere zu formen, ist für die transkriptionelle Regulation und die chromosomale Kondensation essentiell (Ueguchi *et al.*, 1997; Nye & Taylor, 2003). Der oligomere Status von H-NS bei gleichbleibender Konzentration wird von der Temperatur bestimmt (Ceschini *et al.*, 2000): Eine temperaturbedingte Konformationsänderung des H-NS Dimers führt zu einer Reduktion des oligomeren Status des Proteins, wodurch die Dissoziation von der DNA bei 37°C begünstigt wird. Auf diese Weise übt H-NS einen direkten Effekt auf die Thermoregulation der Gene aus (Ono *et al.*, 2005).

#### 1.4.2.3 Der globale Transkriptionsregulator SlyA

Das *slyA*-Gen ("Salmolysin") wurde erstmalig aus *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isoliert. Es wurde zunächst für einen hämolytischen Virulenzfaktor gehalten, da es *E. coli* K-12 zu einem hämolytischen Phänotyp konvertieren kann, wenn es in *trans* auf einem Plasmid eingebracht wird (Libby *et al.*, 1994). Später wurde seine Funktion als die eines Aktivators des kryptischen Cytolysins *clyA* in *E. coli* identifiziert (Libby *et al.*, 1994; Ludwig *et al.*, 1995). In *Salmonella* Infektionen ist das SlyA-Protein essentiell für das Überleben im Wirt, da die Persistenz einer *slyA*-Mutante gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert ist (Stapleton *et al.*, 2002) und weder Peyer'sche Plaques noch mesenterische Lymphknoten, Leber oder Milz können durch die Mutanten effektiv besiedelt werden (Libby *et al.*, 1994). Dabei scheint SlyA für die Zerstörung der murinen M-Zellen (Daniels *et al.*, 1996), für das intrazelluläre Überleben der *Salmonellen* in Makrophagen (Libby *et al.*, 1994) und ihre Replikation in den Peyer'schen Plaques essentiell zu sein (Libby *et al.*, 1994; Daniels *et al.*, 1996). *slyA*-defiziente *Salmonella*-Stämme sind unfähig, im Gewebe des Retikuloendothelialen Systems zu überleben und sind hypersensitiv gegenüber den Produkten des "Respiratorischen Burst" wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Buchmeier *et al.*, 1997). Auch bei der Virulenz in Pflanzen scheint SlyA eine wichtige Rolle zu spielen, da es die Expression vieler Pathogenitätsfaktoren in *D. dadantii* positiv reguliert (Haque *et al.*, 2009).

Das SlyA-Protein reguliert die Synthese von mehreren *Salmonella* Virulenzgenen während der stationären Phase und bei der Infektion der Makrophagen (Buchmeier *et al.*, 1997).

Durch Transkriptom- und Proteomanalysen wurde eine große Zahl von SlyA-abhängigen Genen identifiziert, darunter waren sowohl aktivierte als auch reprimierte Gene (Spory *et al.*, 2002; Stapleton *et al.*, 2002; Navarre *et al.*, 2005). Sie kodieren größtenteils Membranproteine, periplasmatische Proteine oder sekretierte Proteine, manche davon sind in Virulenz und Resistenz gegen antimikrobielle Peptide verwickelt. Für viele Gene konnte jedoch ihre Regulation durch SlyA und ihr Effekt auf die Virulenz noch nicht aufgeklärt werden.

Interessanterweise werden mehrere dieser SlyA-aktivierten Gene auch durch das Zweikomponentensystem PhoP/Q in *S. typhimurium* kontrolliert (Navarre *et al.*, 2005). In die Kontrolle des *slyA*-Gens selbst sind ebenfalls SlyA und PhoP involviert, wobei SlyA reprimierend und PhoP aktivierend auf dessen Expression wirkt (Stapleton *et al.*, 2002; Norte *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2004).

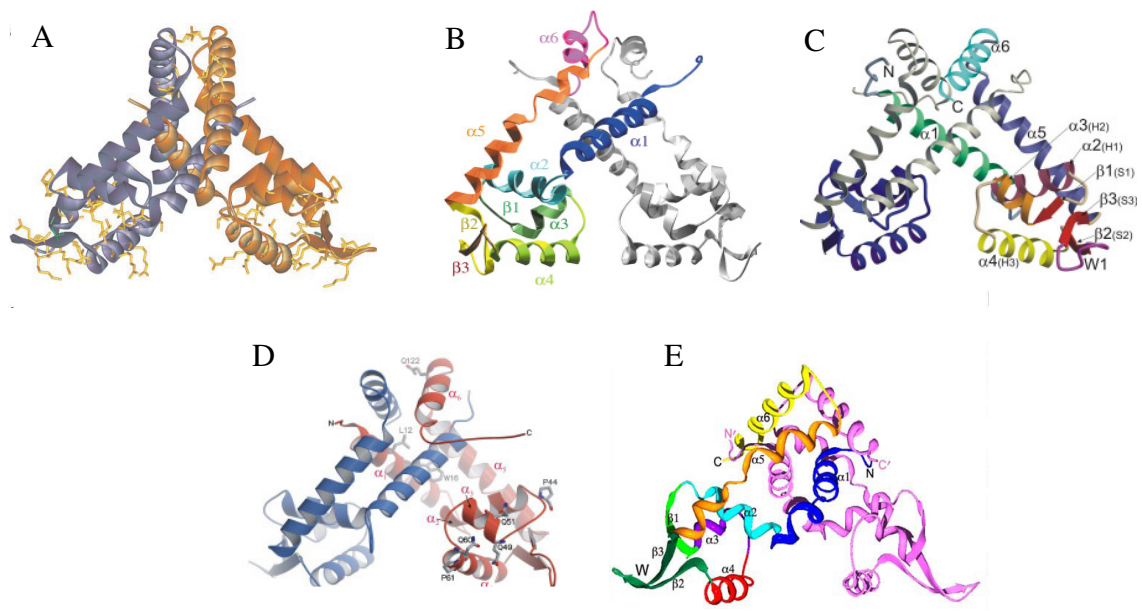
SlyA gehört zu der diversen Gruppe der MarR/SlyA-homologen Transkriptionsregulatoren. Diese Familie umfasst zurzeit 336 putative Mitglieder in 45 Bakterien- und 13 Archäenarten. Sie wird in mindestens zwei Untergruppen unterteilt, die MarR- und die SlyA-ähnlichen Proteine (Thomson *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2003). Ihre Mitglieder regulieren eine Vielzahl biologischer Prozesse, dazu gehören Resistenz gegenüber Antibiotika (MarR in *E. coli*, MexR in *Pseudomonas aeruginosa*) (George & Levy, 1983; Srikumar *et al.*, 1998) und antimikrobiellen Agentien (Rap in *Serratia marcescens*) (Thomson *et al.*, 1997) sowie die Wahrnehmung aromatischer Verbindungen (HpaR und HpcR in *E. coli*) (Roper *et al.*, 1993; Galan *et al.*, 2003). Neben SlyA in *Salmonella typhimurium* regulieren auch einige weitere Familienmitglieder die Virulenz, z. B. RovA in *Yersinia* (Revell & Miller, 2000; reviewed in Ellison *et al.*, 2004), PecS in *Dickeya dadantii* (vormals *Erwinia chrysanthemi*) (Reverchon *et al.*, 2002), Hor in *Pectobacterium carotovorum* (vormals *Erwinia carotovora*) (Thomson, *et al.*, 1997), AphA in *Vibrio cholerae* (Kovacikova *et al.*, 2004) und MgrA in *Staphylococcus aureus* (Ingavale *et al.*, 2005).

Innerhalb der Familie steht SlyA RovA, Rap und Hor besonders nahe, entfernter verwandt ist es mit MarR, HpaR, HpcR, MexR und PecS, sowie SlyA-Ef von *Enterococcus faecalis*, und Hpr und ScoC von *Bacillus subtilis*. Es zeigt außerdem Ähnlichkeiten zu mehreren anderen regulatorischen Proteinen, die Resistenz gegenüber multiplen Antibiotika, organischen Solventen und oxidativem Stress vermitteln (Tran *et al.*, 2005).

Auf der Aminosäureebene bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Familienmitgliedern, weshalb sie vermutlich verschiedene DNA Sequenzen und Signalmoleküle erkennen. Die bislang gebildeten Kristallstrukturen zeigten jedoch, dass sie

alle in Bezug auf die Protein-Struktur sehr ähnlich sind (siehe Abb. 1.7) und Homodimere ausbilden (Alekhshun *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001; Lim, *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003; De Silva *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2005). Außerdem enthalten alle Strukturen Kanäle oder Taschen, die in die Bindung von kleinen regulatorischen Molekülen involviert sein könnten (Alekhshun *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2005).

Jede Untereinheit der Homodimere besteht aus zwei funktionellen Domänen; einer für die Protein-Dimerisierung und einer für die DNA-Interaktion (Alekhshun *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003; De Silva *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2005). Die Protein-Protein-Interaktion wird vor allem durch hydrophobe Wechselwirkungen vermittelt. Die Dimerisierung ist Voraussetzung für die DNA-Bindung, so dass ein mutiertes SlyA-Protein, welches kein Dimer formen kann, zur DNA-Bindung nicht fähig ist (Okada *et al.*, 2007).



**Abb. 1.7: Kristallstruktur-Modelle einiger Vertreter der MarR/SlyA-Familie**

A: SlyAEF aus *Enterococcus faecalis* (Wu *et al.*, 2003). B: MarR aus *E. coli* (Alekhshun *et al.*, 2001). C: MexR aus *Pseudomonas aeruginosa* (Lim *et al.*, 2002). D: RovA aus *Y. pseudotuberculosis* (Tran *et al.*, 2005). E: OhrR aus *B. subtilis* (Hong *et al.*, 2005).

Dimere DNA-Binde-Proteine binden charakteristischerweise an DNA Sequenzen mit palindromischen oder pseudopalindromischen Strukturen. z. B. enthalten die MarR und MexR Bindestellen zwei invertierte 5 bp Sequenzen, die durch 2 bp getrennt sind. SlyA aus *S. typhimurium* bildet 32 kDa große Dimere aus, die die palindromische DNA-Konsensus-Sequenz TTAGCAAGCTAA erkennen (Stapleton *et al.*, 2002).

Neuere Studien offenbarten zwei separate SlyA-Bindestellen im *clyA*<sub>K-12</sub>-Promotor: eine befindet sich stromaufwärts, die andere stromabwärts des Transkriptionsstartpunktes, der 72

bp stromaufwärts des Startcodons ATG liegt (Wyborn *et al.*, 2004; Lithgow *et al.*, 2007). In der stromaufwärts gelegenen Region befinden sich zwei potentielle 12 bp lange SlyA-Erkennungs-Sequenzen: SlyA Ia <sup>-61</sup>TTATCATATTAA<sup>-50</sup> und SlyA Ib <sup>-50</sup>ATAGAAATAAAG<sup>-39</sup>. In der stromabwärts gelegenen Region liegen vier potentielle SlyA-Erkennungs-Sequenzen: SlyA IIa <sup>+47</sup>TTATATATTTAA<sup>+58</sup>, SlyA IIb <sup>+56</sup>TAAAGAGGCGAA<sup>+67</sup>, SlyA IIc <sup>+71</sup>TTATGACTGAAA<sup>+82</sup> und SlyA IId <sup>+85</sup>GTGGCAGATAAA<sup>+96</sup>.

Der DNA-Bindemechanismus für einen Regulator der MarR Familie wurde im Detail anhand der Struktur von an den *ohrA* Operator-Komplex gebundenem OhrR gezeigt (Hong *et al.*, 2005). Dabei offenbarte sich, dass das OhrR-Dimer die Ziel-DNA-Sequenz durch eine Art herausragenden Flügel („wing“), ein "helix-turn-helix" (HTH) Motiv sowie ein "helix-helix" (HH) Motiv lokalisiert (Hong *et al.*, 2005). Während die Bindung durch HTH Motive in Prokaryoten bereits hinlänglich bekannt war, ist das HH Motiv bisher nur bei eukaryotischen Regulatoren beschrieben worden, und die Kombination aus beiden war bisher gänzlich unbekannt. Durch die Bindung von OhrR an die DNA ändert sich dessen Windung, so dass die Helix  $\alpha 4$  der HTH Domäne Kontakt mit der großen Furche aufnimmt und der „wing“-bestehend aus den Strängen  $\beta 2$  und  $\beta 3$  und der Schleife zwischen ihnen- mit der kleinen Furche interagiert. Das HH Motiv, bestehend aus  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ , interagiert mit dem Phosphat-Rückgrat der DNA (Hong *et al.*, 2005).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die MarR/SlyA-Familie von Transkriptionsregulatoren ist in *Enterobacteriaceae* weit verbreitet, und über die Regulation und Funktion einzelner Mitglieder wie SlyA in *Salmonella* und RovA in *Yersinia* gibt es in der Literatur bereits umfangreiche Angaben. Aus diesen geht jedoch hervor, dass trotz der generellen Implikation der MarR/SlyA-ähnlichen Proteine in Stressresistenz und Virulenz der jeweiligen Organismen drastische Unterschiede bei ihrer Regulation und Funktion im Detail bestehen. Erste Voruntersuchungen ergaben in diesem Zusammenhang, dass auch *slyA* in *E. coli* sehr unterschiedlich zu dem nahe verwandten *rovA*-Gen in *Yersinia* reguliert wird und anders auf Umweltstimuli anspricht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in einer möglichst umfassenden Charakterisierung der SlyA-Regulation und Funktion in *Escherichia coli*. Schwerpunkte sollen auf die Analyse der *slyA*-Promotorregion sowie die Identifizierung SlyA-abhängiger Gene gelegt werden. Zu diesem Zweck soll die Struktur und Regulation des *slyA*-Promotors durch Primer-Extension Experimente, Gelretardations-Analysen, DNaseI-Protektions-Versuche und Promotor-deletionsanalysen aufgeklärt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit besteht in der Untersuchung des SlyA-Regulons in EHEC O157:H7 gegenüber *E. coli* K-12. Mit Hilfe der DNA-Chip-Technologie werden dazu Transkriptionsprofile beider Stämme bei Mutation sowie Überexpression des *slyA*-Gens erstellt. Die funktionale Klassifizierung der SlyA-abhängigen Gene soll Aufschluss bezüglich der Rolle des SlyA-Proteins in beiden Organismen geben. Durch Vergleich ihrer regulatorischen Regionen mit aus der Literatur und Ergebnissen dieser Arbeit bekannten SlyA-Bindesequenzen soll darüber hinaus eine Konsensussequenz definiert werden. Die ontologischen Resultate sollen in phänotypischen Experimenten verifiziert werden sowie die SlyA-Abhängigkeit einzelner Gene durch Konstruktion von Reporter-genfusionen überprüft und die Interaktion des SlyA-Proteins mit deren Promotorregionen durch DNA-Bindestudien aufgezeigt werden. Ebenfalls im Zentrum des Interesses steht die Suche nach möglichen Regulatoren der *slyA*-Expression.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Sämtliche verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte sind in den Tabellen 2.1, 2.2 und 2.3 alphabetisch nach Herstellernamen geordnet aufgeführt.

Tab. 2.1: Chemikaliennachweis

Produktbezeichnung	Hersteller
Ammoniumperoxiddisulfat (APS), Borsäure, Formamid, Glycin, HEPES, Magermilchpulver, NBT, Saccharose, SDS (20 %), Tris Base	AppliChem (Darmstadt)
Borsäure	BioMol (Hamburg)
Bacto-Agar, Bacto-Hefeextrakt, Bacto-Trypton, Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Trypsin	Difco (Michigan, USA)
dNTPs (10 mM –Mix), Glykogen, PNPP	Fermentas (St. Leon-Rot)
Methanol	Fischer Scientific (Schwerte)
2-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid, Chloroform, Essigsäure	Fluka (Basel)
Agar	Gerbu (Gaiberg)
Rinohyde polyacrylamide gel strengthener concentrate, UltraPURE destilliertes Wasser, pdN6 Zufalls-Hexanukleotid-Primer	GIBCO/ Invitrogen (Paisley, UK)
RNase AWAY®	MBP (San Diego, USA)
H <sub>2</sub> O <sub>Nuclease-free</sub>	Promega (Mannheim)
Ni-NTA Agarose	Qiagen (Hilden)
Ethanol	Riedel-de Haen (Seelze)
Blockierungsreagenz, CDP-Star, Proteaseinhibitor Mini Complete	Roche Diagnostics, (Mannheim)
Agarose, Ammoniumacetat, Ampicillin, β-Mercapto-Ethanol, Bromphenolblau, BSA, Carbenicillin, Chloramphenicol, Chloroform, CPI, Coomassie Brilliant Blue G250, DEPC, Di-Kaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ), Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid, di-Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ), Dithiothreitol (DTT),	Roth (Karlsruhe)

Ethidiumbromid (EtBr), Formaldehyd, Harnstoff, Glukose, Glycerin, IPTG, Kaliumchlorid (KCl), Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ ), Magnesiumsulfat, Methanol, Natriumacetat Trihydrat, Natriumchlorid (NaCl), Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), Natriumhydrogenphosphat Monohydrat, Natriumhydroxid, Rothiphorese Gel 30/Gel 40, Salzsäure, TEMED, Tetracyclin Hydrochlorid, Trichloressigsäure, Tris, Tris-HCl, Trypton, Tween 20, Xylencyanol, X-Gal	
Arabinose, Ethanolamin, Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Hydroxylamin, Imidazol, Lysozyme, Natriumdodecylsulfat (SDS), PNPP, Sigmacote	Sigma Chemical (St. Louis, USA)
Benzonase, di-Natriumcarbonat, Formaldehyd 37%, Kanamycin, Kanamycindisulfat, Maleinsäure	VWR/Merck (Darmstadt)
Isopropanol	ZLChem TU BS

Tab. 2.2: Verbrauchsmaterialnachweis

Produktbezeichnung	Hersteller
Glaspipetten (2;5;10; 20; 25 ml), Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Brand (Wertheim)
Econo-Säule	BioRad (München)
Petrischalen, 96-well Mikrotiterplatten	Greiner (Solingen)
Dialysefiltermembranen (0,025 $\mu\text{m}$ ), Immobilon-P (PVDF) Membran, Spritzenfilter (0,22 $\mu\text{m}$ )	Millipore (Boston, USA)
Bunsenbrenner LE-E Erdgas	Otto E. Kobe (Marburg)
Enterohämolysin-Agarplatten mit Blut	Oxoid (Hampshire, UK)
2 mm-Elektroporationsküvetten	Peqlab, (Erlangen)
Röntgenfilm Hyperfilm ECL	Pierce/Perbio Science (Bonn)
Falcon Röhrchen (15 ml; 50 ml) Cryoröhrchen, Einmal-küvetten ; 1,5 ml Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Faltenfilter, Filterpapier für Westernblots, Nytran-N Nylonmembran, Sterilfilter (0,2 $\mu\text{m}$ und 0,45 $\mu\text{m}$ ), Whatmanpapier 3MM	Schleicher & Schuell (Dassel)
Glaskolben, -becher und -flaschen	Schott (Mainz)
Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	VWR/Merck (Darmstadt)

Tab. 2.3: Gerätenachweis

Gerät	Hersteller
Laserscanner GenePix 4000	Axon Inc. (Union City, USA)
Spectrophotometer Ultrospec 2100 pro	Biochrom (Berlin)
Dokumentationsanlage Gel Doc 4.2.9, Elektrophoresekammern SDS-Gele, Elektroporator GenePulser Xcell, Microplate Reader Model 680	BioRad (München)
Thermocycler T3	Biometra (Göttingen)
Digitalkamera MPEGMovieEX	Carl Zeiss (Jena)
Elektrophorese Spannungsgeräte E835, EV231	Consort (Turnhout, Belgium)
Hybridisierungskammer	Corning (Lowell, USA)
Refrigerated Superspeed Centrifuge RC5B	DuPont Industries (Quebec, Kanada)
Heizblock Thermomixer comfort (1,5 ml; 2 ml), Zentrifuge 5417, Zentrifuge Mini Spin	Eppendorf (Engelsdorf)
Pipetten (2, 10, 20, 200, 1000 ml)	Gilson (Middleton, USA)
Röntgenfilmkassette	Dr. Goos-Suprema GmbH (Heidelberg)
Heiz- und Rührgerät MR3001	Heidolph (Kelheim)
Pipettboy acu	Integra Biosciences (Fernwald)
Vakuumpumpe	KNF Lab (Freiburg)
Elektrophoresekammer Sequenziergele Model S2001, Elektrophorese Spannungsgerät Model PS9009 TC	Invitrogen/Life Technologies (Paisley, UK)
Röntgen-Entwicklermaschine Optimax Typ TR	MS Laborgeräte (Wiesloch)
Zeitmesser	Oregon Scientific (Neu-Isenburg)
Bunsenbrenner LE-E Erdgas	Otto E. Kobe (Marburg)
Elektrophoresekammern, Agarosegele, Reinstwasseranlage Milli-Q System, Thermocycler primus 25, Nanodrop	PeqLab (Erlangen)
Feinwaage BP61S, Waage universal	Sartorius (Göttingen)
pH-Meter	Schott (Mainz)
Vortex-Gerät Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Zentrifugen: 2K15C	Sigma Chemical (St. Louis, USA)

French Pressure Cell Press	Thermo electron Corporation / Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
----------------------------	--

### 2.1.2 DNA- und Proteinmarker, Antikörper und Enzyme

In Tabelle 2.4 sind sämtliche zum Erstellen der Arbeit benutzten DNA- und Proteinmarker, sowie Antikörper und Enzyme aufgeführt. Die Liste wurde alphabetisch nach dem Namen des Herstellers geordnet.

Tab. 2.4: Nachweis von DNA- und Proteinmarkern, Antikörpern und Enzymen

Produktbezeichnung	Hersteller
Mango- <i>Taq</i> -Polymerase, 10x Mango Puffer	Bioline (Luckenwalde)
Anti-SlyA-Antikörper, Anti-RpoS-Antikörper	Davids Biotechnologie (Regensburg)
Gene Ruler DNA Ladder Mix, (Orange) Loading Dye Solution 6x, Protein Ladder, PAGE-Ruler, <i>prestained</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
Phusion Polymerase, 5x HF Puffer	Finnzymes (Espoo, Finnland)
SuperScript II Reverse Transkriptase, 5x First Strand Puffer	Invitrogen/Life Technologies (Paisley, UK)
Prestained Protein Marker broad range, Restriktionsendonukleasen und deren Puffer, T4-DNA-Ligase Puffer, 10x Ligase Puffer, <i>Taq</i> -DNA-Polymerase, ThermoPol Puffer	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Shrimp alkalische Phosphatase, 5x SAP Puffer, T4-DNA-Ligase, Rapid-Ligationbuffer	Promega (Mannheim)
ProofStart-DNA-Polymerase, RNase A	Qiagen (Hilden)
Anti-DIG-AP-Antikörper, DigPCR-Nucleotide Mix, DNase I, RNase A, T4-DNA-Ligase, 10x Ligation Puffer	Roche (Mannheim)
100 bp-DNA ladder extended, 1x loading dye	Roth (Karlsruhe)
Anti-Kaninchen-IgG-Ziege-AP	Sigma Chemical (St. Louis, USA)
Benzonase	VWR/Merck (Darmstadt)

### 2.1.3 Verwendete Kits

Tabelle 2.5 führt die in dieser Arbeit verwendeten Kits auf, alphabetisch nach dem Namen des Herstellers sortiert.

Tab. 2.5: Nachweis von Kits

Produkt Bezeichnung	Hersteller
Ultraclean GelSpin DNA Purification Kit, Ultraclean PCR Purification Kit, Ultraclean Soil DNA Kit, Ultraclean Standard Mini Plasmid Prep Kit	MoBio (Carlsbad, USA)
Coomassie Protein Assay Reagent Kit	Pierce/Perbio Science (Bonn)
SV total RNA isolation System	Promega (Mannheim)
QIAexpressionist Kit, QIAfilter Plasmid Midi Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick PCR Purification Kit, RNeasy RNA Isolation Kit	Qiagen (Hilden)
Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit	USB (Cleveland, USA)

### 2.1.4 Medien

#### 2.1.4.1 Medien zur Anzucht von *Escherichia coli*

Die verwendeten *E. coli* Stämme wurden in Luria-Bertani (LB)-Medium angezogen (nach Sambrook *et al.*, 1989). Für Übertagkulturen zur Herstellung elektrokompenter Bakterien und zur phänotypischen Expression nach der Elektroporation wurden die Bakterien in reichhaltigem DYT-Medium (*Double Yeast Tryptone* Medium) kultiviert (nach Miller, 1992). Die Zusammensetzung der verwendeten Medien ist in Tabelle 2.6 aufgeführt. Zur Herstellung fester Nährböden wurden dem jeweiligen Medium 1,5 % Agar zugegeben.

Tab. 2.6: Wachstumsmedien für die Anzucht von *Escherichia coli*

Voll-Medien	Zusammensetzung
DYT-Medium (Double Yeast Tryptone; Vollmedium) (Miller, 1992)	10 g/l Hefeextrakt, 16 g/l Trypton, 5 g/l NaCl
LB-Medium (Luria-Bertani; Vollmedium) (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 10 g/l Trypton
LB-Festmedium	LB-Medium, 18 g/l Agar
RPMI-Medium	Bezogen von Firma Biochrom (Berlin)
Minimal-Medien	Zusammensetzung
10 x MMA-Medium	105 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 4 g/l NaCitrat; 45 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 10 g/l (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>
1 x MMA-Medium	10% 10x MMA; 0,2% CAA (Casaminosäuren), 1% LB; 0,2% Glucose; 1 mM MgSO <sub>4</sub>
SOC-Medium	5 g/l Hefeextrakt; 0,5 g/l NaCl; 10 ml/l 1 M MgCl <sub>2</sub> ; 20 g/l Trypton; 2,5 ml/l 1 M KCl; 10 ml/l MgSO <sub>4</sub>

### 2.1.5 Antibiotika und weitere Medienzusätze

Medienzusätze wurden in entsprechenden Konzentrationen (siehe Tab. 2.7) dem autoklavierten Medium hinzugefügt. Die verwendeten Medienzusätze wurden als konzentrierte Stammlösungen angesetzt und mit Ausnahme von Ethanol- und DMF-haltigen Lösungen sterilfiltriert.

Tab. 2.7: Antibiotika und weitere Medienzusätze

Medienzusatz und Funktion	Abkürzung	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin, Antibiotikum	Ap <sup>R</sup>	50 mg/ml H <sub>2</sub> O	50 µg/ml
Arabinose	Ara	20%	0,2%
Farbindikator in Festmedien	BCIP	10 mg/ml DMF	35 µg/ml
Carbenicillin, Antibiotikum	Cb <sup>R</sup>	100 mg/ml H <sub>2</sub> O	100 µg/ml
Chloramphenicol, Antibiotikum	Cm <sup>R</sup>	30 mg/ml 70 % Ethanol	30 µg/ml

Induktion der <i>slyA</i> -Expression in bestimmten Bakterienstämmen	IPTG	1 M in H <sub>2</sub> O	1-2 mM
Kanamycin, Antibiotikum	Kn <sup>R</sup>	50 mg/ml H <sub>2</sub> O	50 µg/ml
Tetracyclin, Antibiotikum	Tc <sup>R</sup>	5 mg/ml 70 % Ethanol	5 µg/ml
(5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid), Farbindikator in Festmedien	X-Gal	10 mg/ ml DMF	40 mg /l

### 2.1.6 Bakterienstämme und Plasmide

In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme und Plasmide sind in den Tabellen 2.8 und 2.9 aufgeführt.

Tab. 2.8: Bakterienstämme

Stamm	Merkmale	Referenz/Quelle
BL21λDE3	F <sup>-</sup> , <i>gal met r<sup>-</sup> m<sup>-</sup> hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ<sub>lys</sub> p<sub>lac</sub>UV5-T7-Gen1, <i>plac<sup>f</sup> lacI</i></i>	Studier & Moffat, 1986
BW27558	BW25113 <i>phoQP1244</i>	Zhou <i>et al.</i> , 2003
BW25113	<i>E. coli</i> K-12 <i>lacI</i> p4000( <i>lac<sup>f</sup></i> ) <i>rrnB3 lacZ4787 hsdR514 (araBAD)567 (rhaBAD)568 rph-1</i>	Datsenko & Wanner, 2000
CC118λpir	F <sup>-</sup> Δ( <i>ara-leu</i> ) 7697 Δ( <i>lacZ</i> )74 Δ( <i>phoA</i> )20 <i>araD139 galE galK thi rpsE rpoB arfE<sup>am</sup> recA1, λpir</i>	Manoil & Beckwith, 1986
DH5αZ1	<i>deoR endA1 gyrA96 hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) recA1 relA1 supE44 thi-1 Δ(lacZYA-argF)U169 Φ80/lacZΔM15, F<sup>-</sup> λ<sup>-</sup> PN<sub>25</sub>/tetR P<sub>lacI</sub><sup>q</sup>/lacI Sp<sup>R</sup></i>	Lutz & Bujard, 1997
WO 4 (DH5αZ1 <i>lon</i> )	DH5αZ1Δ <i>lon</i>	Wiebke Opitz, unveröffentlichte Daten
DH5αZ1 <i>clp</i>	DH5αZ1Δ <i>clp</i>	Wiebke Opitz, unveröffentlichte Daten
EAEC 17-2	O3:H2	Vial <i>et al.</i> , 1988
EHEC	Serotyp O103:H2 <i>stx1 eaec</i>	Bockemühl <i>et al.</i> ,

3942/96		1997
EHEC 4367/97	wt Serovar O157:H7 <i>stx2 eaec</i>	Herbert Schmidt, Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg
EHEC EDL933	Serotyp O157:H7 <i>stx1, stx2, eaec</i>	O'Brien <i>et al.</i> , 1984
EHEC <i>slyA</i>	EHEC EDL933 <i>slyA::kan</i>	diese Arbeit
EIEC 12860	wt Serovar O124 : HND	Schmidt <i>et al.</i> , 1999
EIEC 78-5	wt Serovar O124	Herbert Schmidt, Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg
EIEC <i>slyA</i>	EIEC 12860 <i>slyA::Ap<sup>R</sup></i>	Spory <i>et al.</i> , 2002
EPEC 2348/69	(O127 H6) <i>stx- eaec</i>	Levine <i>et al.</i> , 1978
EPEC JPN15	Plasmid-bereinigtes Derivat von E2348/69 pMAK	Jerse <i>et al.</i> , 1990
EPEC <i>slyA</i>	EPEC JPN15 <i>slyA::kan</i>	diese Arbeit
ETEC 117/86	wt Serovar O6:H-	Herbert Schmidt, Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg
IMW41	MC4100 <i>lrhA::spc<sup>R</sup></i>	Bongaerts <i>et al.</i> , 1995
MC4100	F- $\Delta(\text{argF-lac})$ U196 <i>rpsL150 deoC1 relA1 ptsF25 flbB5501 rbsR</i>	Casadaban, 1976
MC4100 <i>slyA</i>	MC4100 <i>slyA::kan<sup>R</sup></i>	Diese Arbeit
MB30	MC4100 <i>hns205::Tn10</i>	Barth <i>et al.</i> , 1995
MG1655	F <sup>-</sup> $\lambda$ - <i>ilvG-rfb-50 rph-1</i>	Blattner <i>et al.</i> 1997
PD32	MC4100 <i>hns206::Tn10 Ap<sup>R</sup></i>	Dersch <i>et al.</i> , 1993
RH90	MC4100 <i>rpoS 354::Tn10</i>	Lange & Hengge- Aronis, 1991
S17-1 $\lambda$ pir	<i>thi pro res<sup>-</sup> mod<sup>+</sup> Sm<sup>R</sup> Tp<sup>R</sup> recA</i> , (RP4-2 <i>Tc::Mu-Km::Tn7</i> ), $\lambda$ pir	Simon <i>et al.</i> , 1983



Tab. 2.9: Plasmide

Plasmid	Merkmale	Referenz
pACYC177	3,94 kb Vektor; p15a; Ap <sup>R</sup> , Kn <sup>R</sup>	Chang & Cohen, 1987
pAW1	6,1 kb Vektor; pBAD30-Derivat; <i>slyA</i> ' <sub>K-12</sub> <sup>+</sup> a Primer 162/163; p15A; Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
pAW4	6,1 kb Vektor; pBAD30-Derivat; <i>slyA</i> ' <sub>EIEC</sub> <sup>+</sup> a Primer 162/163; p15A; Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
pAW8	6,5 kb Vektor; pBAD33-Derivat; <i>slyA</i> ' <sub>EIEC</sub> <sup>+</sup> ; Primer 162/163; p15A; Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pAW13	7,44 kb Vektor; pJL28-Derivat; <i>slyA</i> ' <sub>K-12</sub> <sup>-</sup> ' <i>lacZ</i> (hyb2) <sup>a</sup> ; Primer 162/252; ColE1; Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
pAW15	7,44 kb Vektor; pJL28-Derivat; <i>slyA</i> ' <sub>EPEC</sub> <sup>-</sup> ' <i>lacZ</i> (hyb2); Primer 162/252; ColE1; Ap <sup>R</sup> ;	diese Arbeit
pAW16	7,44 kb Vektor; pJL28-Derivat; <i>slyA</i> ' <sub>EIEC</sub> <sup>-</sup> ' <i>lacZ</i> (hyb2); Primer 162/252; ColE1; Ap <sup>R</sup> ;	diese Arbeit
pAW20	7,9 kb Vektor; pHSG575-Derivat; <i>slyA</i> ' <sub>K-12</sub> <sup>-</sup> ' <i>lacZ</i> (hyb2); Primer 162/252; pSC101; Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pAW21	7,9 kb Vektor; pHSG575-Derivat; <i>slyA</i> ' <sub>EPEC</sub> <sup>-</sup> ' <i>lacZ</i> (hyb2); Primer 162/252; pSC101; Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pAW22	7,9 kb Vektor; pHSG575-Derivat; <i>slyA</i> ' <sub>EIEC</sub> <sup>-</sup> ' <i>lacZ</i> (hyb2); Primer 162/252; pSC101; Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pAW24	5,7 kb Vektor; pET28a-Derivat; <i>slyA</i> <sup>+</sup> , Primer 505/506; ColE1, Kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pAW26	7,6 kb Vektor; pGP20-Derivat; <i>clpA</i> <sup>-</sup> ' <i>lacZ</i> (74); Primer 598/599; pSC101; Tc <sup>R</sup>	diese Arbeit
pAW27	7,4 kb Vektor; pJL28-Derivat; <i>slyA</i> ' <sub>EHEC</sub> <sup>-</sup> ' <i>lacZ</i> ; (hyb2), Primer 162/252; ColE1; Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
pAW28	7,9 kb Vektor; pHSG575-Derivat; <i>slyA</i> ' <sub>EHEC</sub> <sup>-</sup> ' <i>lacZ</i> (hyb2); Primer 162/252; pSC101; Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pAW31	7,9 kb Vektor; pGP20-Derivat; <i>gadA</i> <sup>-</sup> ' <i>lacZ</i> (82); Primer 846/894, pSC101; Tc <sup>R</sup>	diese Arbeit
pAW34	7,9 kb Vektor; pGP20-Derivat; <i>evgA</i> <sup>-</sup> ' <i>lacZ</i> (85); Primer I43/I44; pSC101; Tc <sup>R</sup>	diese Arbeit
pAW37	7,3 kb Vektor; pJL28-Derivat; <i>slyA</i> ' <sub>MC4100</sub> <sup>-</sup> ' <i>lacZ</i> ; (hyb2), Primer 781/252; ColE1; Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit

## Material und Methoden

pAW38	7,1 kb Vektor; pJL28-Derivat; <i>slyA'</i> <sub>MC4100</sub> -' <i>lacZ</i> ; (hyb2), Primer 782/252; ColE1; Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
pAW39	7 kb Vektor; pJL28-Derivat; <i>slyA'</i> <sub>MC4100</sub> -' <i>lacZ</i> ; (hyb2), Primer 783/252; ColE1; Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
pAW66	7,9 kb Vektor; pGP20-Derivat; <i>clyA'</i> -' <i>lacZ</i> (74); Primer I488/599; pSC101; Tc <sup>R</sup>	diese Arbeit
pBAD30	4,9 kb Vektor; Promotor des <i>araBAD</i> -Operons, <i>araC</i> ; p15A; Ap <sup>R</sup>	Guzman <i>et al.</i> , 1995
pBAD33	5,3 kb Vektor; Promotor des <i>araBAD</i> -Operons, <i>araC</i> ; p15A; Cm <sup>R</sup>	Guzman <i>et al.</i> , 1995
pET28a	5,4 kb Vektor; T7 Promotor, 6xHis-tag C-terminal, pBR322 ori, Kn <sup>R</sup>	Novagen
pGP20	7,3 kb Vektor; <i>lacZ'</i> , pSC101 ; Tc <sup>R</sup>	Petra Gerlach
pHSG575	3,61 kb Vektor; pHSG415r-Derivat; <i>lacZ</i> ; pSC101 ; Cm <sup>R</sup>	Vanden Boom & Cronan, 1990
pJL28	6,34 kb Vektor; pMLB1034-Derivat; <i>lacZ'</i> ; <i>lacY'</i> ; ColE1; Ap <sup>R</sup>	Lucht <i>et al.</i> , 1994
pKAB5	7,7 kb Vektor; pHSG575-Derivat; <i>gadA'</i> -' <i>lacZ</i> ; (hyb2), Primer 162/252; pSC101;Cm <sup>R</sup>	Katrin Benson, unveröffentliche Daten
pKAB6	7,5 kb Vektor; pHSG575-Derivat; <i>gadA'</i> -' <i>lacZ</i> ; (hyb2), Primer 781/252; pSC101;Cm <sup>R</sup>	Katrin Benson, unveröffentliche Daten
pKAB7	7,3 kb Vektor; pHSG575-Derivat; <i>gadA'</i> -' <i>lacZ</i> ; (hyb2), Primer 783/252; pSC101;Cm <sup>R</sup>	Katrin Benson, unveröffentliche Daten
pKAB8	7,2 kb Vektor; pHSG575-Derivat; <i>gadA'</i> -' <i>lacZ</i> ; (hyb2), Primer I313/252; pSC101;Cm <sup>R</sup>	Katrin Benson, unveröffentliche Daten
pKAB9	7,1 kb Vektor; pHSG575-Derivat; <i>gadA'</i> -' <i>lacZ</i> ; (hyb2), Primer I314/252; pSC101;Cm <sup>R</sup>	Katrin Benson, unveröffentliche Daten
pKOBEG- <i>sacB</i>	6,5 kb Vektor mit Rekombinationsfunktion <i>sacB'</i> , <i>exo</i> <sup>+</sup> , <i>bet</i> <sup>+</sup> , <i>gam</i> <sup>+</sup> , Cm <sup>R</sup>	Derbise <i>et al.</i> , 2003
pMW132	Ca. 6,4 kb Vektor, pET28A-Derivat, <i>lrhA</i> <sup>+</sup> , pBR322	Lehnen <i>et al.</i> , 2002

	ori, Kn <sup>R</sup>	
psynp9	pRL40.1-Derivat, psynp9::lacZ, ColE1; Ap <sup>R</sup>	Typas <i>et al.</i> , 2007

a. *slyA* aus CC118λpir

b. *slyA* aus MC4100

hyb1: Das *lacZ*-Gen aus *E. coli* K-12 wurde an die 70. Base der *slyA* Gene aus *E. coli* K-12, EPEC und EIEC fusioniert

hyb2: Das *lacZ*-Gen aus *E. coli* K-12 wurde an die 378. Base der *slyA*-Gene aus *E. coli* K-12, EPEC und EIEC fusioniert

## 2.1.7 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen und sind in der Tabelle 2.10 aufgeführt. Restriktionsschnittstellen sind durch Unterstriche gekennzeichnet, kleingeschriebene Buchstaben markieren zur Kanamycin-Kassette homologe Bereiche eines Primers.

Tab. 2.10: Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Restriktionsschnittstelle
Primer 162	5'-GCGGCGGGATCCCTTTGCGAGGTCAGATTGC-3'	<i>Bam</i> HI
Primer 163	5'-GGGCCC <u>GT</u> CGACAGTCAGGTGACCGTTTCTCC-3'	<i>Sal</i> I
Primer 165	5'-GGGCCC <u>GT</u> CGACGACGCGATAGCGTCGCATCC-3'	<i>Sal</i> I
Primer 251	5'-GCGCGCAAGCTTGGTCTATCAGAGCACGCC-3'	<i>Hind</i> III
Primer 252	5'-GCGCGCAAGCTTGCTCCAGTTCGTCTGCGG-3'	<i>Hind</i> III
Primer 443	5'-GCGCGCGAGCTCCCAGCCACGAAGCAGGCGG-3'	<i>Sac</i> I
Primer 464	5'-ccaaatgcagcaatacattgttttagcaatacaattgctgcac actattctaaaagccGGTGATTTGAACTTTTGCTTTGC-3'	keine
Primer 465	5'-ccagcaatggcagtcaggtgaccgtttctccgcgctaaataagttgcgt gtggCCAGTGTTACAACCAATTAACC-3'	keine
Primer 505	5'-GCGGCGGCTAGCATGAAATTGGAATCGCCACTAGG-3'	<i>Nhe</i> I
Primer 506	5'-GGGCGCCTCGAGCCCTTCATTTACCCCTTTG-3'	<i>Xho</i> I
Primer 598	5'-CGCGCGGAATTCGAAGACTTCGCCATAATGAC-3'	<i>Eco</i> RI
Primer 599	5'-CGCGCGCTGCAGTCTAATGCTCCATCTGCGG-3'	<i>Pst</i> I
Primer 781	5'-GCGGCGGGATCCCCCGTCGCGTGTCCACGG-3'	<i>Bam</i> HI
Primer 782	5'-GCGGCGGGATCCCCAGCCACGAAGCAGG-3'	<i>Bam</i> HI
Primer 783	5'-GCGGCGGGATCCCCAGATGACGAATCC-3'	<i>Bam</i> HI
Primer 846	5'-GCGCGCGAATTCGGTGGAATTATTCTCGGCGG-3'	<i>Eco</i> RI
Primer 894	5'-GCGCGGAATTCGCGGATAGTAGAAATGGCC-3'	<i>Eco</i> RI
Primer I43	5'-GGGCGCGGATCCCCATTGACCAATAGGCATAGG-3'	<i>Bam</i> HI
Primer I44	5'-GGGCGCAAGCTTCTAAGATTTCAATATCGTTTTTG-3'	<i>Hind</i> III
Primer I56	5'-CCGCCTGCTTCGTGGCTGG-3'	keine
Primer I60	5'-GGCGATTCCAATTTTCATCTCC-3'	keine
Primer I61	5'-GGAAATTACGGCGGCGGATATTGG-3'	keine

Primer I62	5'-CCGTTAACAGCTTCTGGTCC-3'	keine
Primer I70	5'-CCCGTCGCGTGTCCACGG-3'	keine
Primer I71	5'-CCAGCCACGAAGCAGG-3'	keine
Primer I84	5'-GCGGCGGGATCCGCTCGGCGATCTGAAAGG-3'	<i>Bam</i> HI
Primer I273	5'-CCATATGCGCACCAACCGTGCCAG-3'	keine
Primer I313	5'-GCGCGCGGATCCGTAGATTCTTTACGACC-3'	<i>Bam</i> HI
Primer I314	5'-GCGCGCGGATCCATATGTCTGACGGTAACC-3'	<i>Bam</i> HI
Primer I315	5'-GCGCGCGGATCCAATTGCTGCACACTATTC-3'	<i>Bam</i> HI
Primer I334	5'-AGTACGGACCAGTGATGG-3'	keine
Primer I347	5'-GGTCTGGAGGTAAGTATGG-3'	keine
Primer I488	5'-GCGCCGGAATTCAACGTAATCTGCTGCCGG-3'	<i>Eco</i> RI

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Wachstumsbedingungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme wurden bei 37°C unter aeroben Bedingungen auf Festmedien oder in Flüssigkulturen angezogen. Für einzelne Experimente zur Untersuchung spezieller Umweltbedingungen waren gesonderte Bedingungen erforderlich. Dazu wurden die Bakterien vergleichsweise bei einer Temperatur von 25°C kultiviert. Kleine Volumina von Flüssigkulturen wurden in einem Reagenzglasroller oder -schüttler inkubiert, größere Volumina in Schikanekolben auf einem Schütteltisch. Zur Überexpression des SlyA-Proteins wurde 1 l LB-Medium in einem 2 l Schikanekolben bei 37°C geschüttelt.

### 2.2.2 Sterilisation

Autoklavierbare Lösungen wurden im Autoklaven für 20 min bei 121°C und 1,3 bar sterilisiert. Hitzeempfindliche Stammlösungen wurden mit Hilfe eines Filters von 0,2 µm Porengröße sterilfiltriert. Glaspipetten und Glaswaren wurden in einem Hitzeschrank bei 180°C trockensterilisiert.

### 2.2.3 Bestimmung der bakteriellen Zelldichte

Die Bakteriendichte wurde über die Trübung der Bakterienkultur spektralphotometrisch bei 600 nm ermittelt (Optische Dichte OD<sub>600</sub>). Eine OD<sub>600</sub> von 1 einer Bakterienkultur entspricht ungefähr  $1 \times 10^9$  Zellen/ml (Sambrook *et al.*, 1989) und einem Proteingehalt von 150 µg Protein (Miller, 1992). Als Referenz diente das jeweilige Wachstumsmedium.

### 2.2.4 Phänotypischer Nachweis der ClyA-Synthese

Zum Nachweis der SlyA-abhängigen Synthese des Hämolyins ClyA in verschiedenen *E. coli* Virotypen wurden Enterohämolysin-Blutagar-Fertigplatten der Firma Oxoid verwendet. Das Ausmaß der Hämolyisinbildung ist auf diesen Platten anhand von trüben Hämolysehöfen zu erkennen. Die Enterohämolysinplatten wurden mit Einzelkolonien von Vorkulturen auf Antibiotika-haltigen LB-Platten inokuliert und für 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Dokumentation wurden die Platten mit einer Digitalkamera (MPEGMovieEX, Zeiss) fotografiert.

### 2.2.5 Motilitätsassay

In Anlehnung an die von Tisa und Adler beschriebene Methode (1995) wurden 2 µl einer Übernachtskultur des zu untersuchenden Stammes auf Trypton-Weichagar-Platten getropft und für 48 Stunden bei 28°C inkubiert. Das Schwärmvermögen eines Stammes wurde anhand des Durchmessers der sog. Schwarmringe um den Tropfpunkt ermittelt.

**Trypton-Weichagar-Platten:** 1% Trypton; 0.5% NaCl; 0.3% Bacto-Agar

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

Alle nicht im Einzelnen aufgeführten molekularbiologischen Standardmethoden wurden nach Maniatis und Sambrook *et al.* (1989) oder dem Protokoll des jeweiligen Herstellers gemäß durchgeführt. Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mit Kits der Firmen Qiagen und MoBio.

### 2.3.1 DNA-Isolierung

Zur Isolierung einer bestimmten DNA-Bande aus einem Agarosegel wurde das QIAquick Gel Extraction Kit eingesetzt. Zur Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktionsverdauansätzen, sofern nicht aus dem Agarosegel isoliert, wurden das QIAquick PCR Purification Kit oder das Ultraclean PCR Purification Kit von MoBio verwendet. Die DNA wurde mit HPLC-gereinigtem H<sub>2</sub>O eluiert. Alle Verfahren wurden nach Herstellervorschriften durchgeführt.

Um die Konzentration und Reinheit der DNA-Lösungen photometrisch zu bestimmen, wurde die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich aus der Optischen Dichte bei 260 nm, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und mit fünfzig, einem DNA spezifischen Multiplikationsfaktor. Eine OD<sub>260nm</sub> von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

Das Verhältnis der OD<sub>260nm</sub> zu der OD<sub>280nm</sub> beschreibt die Verunreinigung der DNA Lösung mit Proteinen und sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen.

### 2.3.2 Gelelektrophorese und -extraktion von DNA

Die Auftrennung von DNA erfolgte in 0,8%igen Agarosegelen bei 100V. Als Laufpuffer wurde 1xTAE verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit einem Zehntel ihres Volumens Ladepuffer versetzt. Anschließend wurden die Agarosegele für 15 min in einem Ethidiumbromid-Bad (1 µg/ml in H<sub>2</sub>O) gefärbt. Die Fotografie und Auswertung erfolgte mit einer Dokumentationsanlage von BioRad und der dazugehörigen Software „QuantityOne“.

### 2.3.3 Sequenzspezifische DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Ein analytischer Restriktionsansatz setzte sich aus einem Gesamtvolumen von 20 µl mit den Komponenten 14 µl Wasser (Millipore), 2 µl 10x Restriktionspuffer (je nach Enzym), BSA (Endkonzentration 0,1mg/ml), DNA (2 µg) und Enzym (1 U/µl DNA) zusammen. Die Restriktion erfolgte je nach Enzym bei 37°C oder 25°C für zwei Stunden. Die Enzyme wurden anschließend der Anweisung des Herstellers entsprechend durch Hitze inaktiviert oder, falls dies nicht möglich war, durch Aufreinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit oder Ultraclean PCR Purification Kit aus dem Ansatz entfernt. Für einen präparativen Restriktionsverdau wurden 10 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl restringiert.

### 2.3.4 Dephosphorylierung

Die mit den entsprechenden Restriktionsendonucleasen geschnittene Vektor-DNA wurde an den 5'-Enden durch eine dreißigminütige Inkubation mit Shrimp alkalischer Phosphatase (1 U/100 µl-Ansatz) bei 37°C dephosphoryliert. Anschließend wurde das Enzym durch eine zwanzigminütige Inkubation bei 65°C inaktiviert.

### 2.3.5 Ligation und Transformation

Für Ligationen wurden die T4-Ligasen von Promega, New England Biolabs und Roche verwendet (siehe Tab. 2.4). Die Reaktionen wurden nach Herstelleranweisung angesetzt und über Nacht bei 16°C inkubiert. 4 µl des Ligationsansatzes wurden für 15 min auf einer Dialysefiltermembran (0,025 µm Porengröße) in einer wassergefüllten Petrischale dialysiert. 3 µl des dialysierten Ansatzes wurden anschließend mit 40 µl elektrokompenten *E. coli* Zellen gemischt und bei 2,5 kV im Gene Pulser Xcell transformiert. Nach Zugabe von 1 ml DYT Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert und auf Selektivmedium ausplattiert.

### 2.3.6 Polymerasekettenreaktion

Für die Amplifikation von DNA zu Kontrollzwecken und als Template für Gelretardationsexperimente und DNaseI-Footprint-Analysen wurden die *Taq*-Polymerase und die Mango-*Taq* Polymerase verwendet. Für Klonierungen wurden die *Phusion*-Polymerase, die ProofStart-Polymerase und die *Pfu*-Polymerase eingesetzt. Die PCR wurde nach Hersteller-Anweisung durchgeführt.

### 2.3.7 Konstruktion von Deletionsmutanten

Die Konstruktion der *slyA*-Deletionsmutanten erfolgte mit Hilfe des RED-Rekombinase-Systems, wobei die deletierten Gene durch eine Kanamycin-Kassette ersetzt wurden (Derbise *et al.*, 2003). Dazu wurde in einer PCR unter Verwendung von ca. 80 bp langen Primern ein Mutagenesefragment konstruiert, das die Kanamycin-Kassette enthielt und von Sequenzen flankiert wurde, die zum Zielgen homolog waren. Das ca. 20-mere 3'-Ende des Primers hybridisierte mit der Kanamycin-Kassette, das 5'-Ende war homolog zu einer stromauf- oder abwärts vom Zielgen gelegenen Sequenz.

Die Kanamycin-Kassette wurde mit Hilfe der Primer 464/465 (siehe Tab. 2.10) amplifiziert, als Matrize diente Plasmid pACYC177. Das Mutagenesefragment wurde anschließend in den Zielstamm transformiert, der das Plasmid pKOBEG-*sacB* enthielt. Dieses Plasmid, das die Rekombinationswahrscheinlichkeit für lineare DNA erhöht, kodiert die Phagengene *exo*, *beta* und *gam*. Gam hindert die RecBCD Nuklease am Angriff auf lineare DNA, während Exo und Beta die Rekombinationsaktivität der Zellen erhöhen.

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurden 200 ml LB-Cm aus einer Übernachtskultur des Zielstammes 1:50 angeimpft und die Zellen bei 37°C schüttelnd angezogen. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,2 wurde die Rekombinase-Expression durch Zugabe von 0,2 % Arabinose induziert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 weiter kultiviert. Nach 15-30minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterienzellen dreimal bei 4°C zentrifugiert (10 min, 9000 rpm (2K15C, Sigma) und das Pellet in 30 ml kaltem 10% Glycerin gewaschen. Das Bakterienpellet wurde anschließend 1:1000 in 10% Glycerin resuspendiert. 40 µl Aliquots der kompetenten Zellen wurden mit 6, 8, 15 oder 20 µl der linearen DNA transformiert und für die phänotypische Expression 1 Stunde in 1 ml DYT-Medium bei 25°C inkubiert. Eine Selektion auf rekombinante Klone erfolgte auf kanamycinhaltigen LB-Platten bei 37°C. Um den Verlust des pKOBEG-*sacB* Plasmids zu forcieren, wurden die Bakterien über Nacht bei 37°C inkubiert. Um Kolonien zu identifizieren, die das pKOBEG-*sacB* Plasmid verloren hatten, wurden die Bakterien auf LB-Platten ohne Natriumchlorid mit 10 % Sucrose ausplattiert. Schnelles Wachstum auf diesen Platten sowie keine Chloramphenicol-Resistenz zeigte den Verlust des Plasmides an.

Die korrekte Integration der Resistenzkassette im Locus des Zielgens wurde durch zwei PCR Ansätze nachgewiesen. Ein Primerpaar hybridisierte mit stromauf- und abwärts gelegenen Sequenzen des Zielgens. Da das Zielgen eine andere Größe als die Resistenzkassette aufwies, konnte die Deletion durch Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Ein Primer des zweiten PCR-Ansatzes hybridisierte mit einer stromaufwärts des Zielgens lokalisierten Sequenz, der zweite mit einer innerhalb der Kanamycin-Resistenzkassette lokalisierten. Durch diese Kombination konnte nur bei korrekter Integration der Kassette ein Amplifikat entstehen.



### 2.3.8 Konstruktion der Plasmide pAW1 – pAW8 und pAW32

Um die *slyA*-Allele von *E. coli* K-12 CC118 $\lambda$ pir, *E. coli* K-12 MC4100, EIEC 12860 und EPEC JPN15 in ihrer Funktion zu vergleichen, wurden diese inklusive der 5'-regulatorischen Region mit den Primern 162 und 163 (siehe Tab. 2.10) aus dem Chromosom der jeweiligen Organismen amplifiziert.

Da auch der Einfluss von SlyA auf die Expression unterschiedlicher Gene untersucht sowie *slyA*-Deletionen komplementiert werden sollten, wurden die *slyA*-Sequenzen der verschiedenen Stämme hinter den Arabinose-induzierbaren P<sub>BAD</sub>-Promotor der *low copy* Vektoren pBAD30 (Ap<sup>R</sup>) und pBAD33 (Cm<sup>R</sup>) kloniert. Das 1248 bp lange Fragment wurde mittels des PCR-Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt, mit *Sal*I und *Bam*HI geschnitten und in die dephosphorylierten Vektoren pBAD30 und pBAD33 ligiert. Die *slyA*-Expression kann nach Bedarf durch Zugabe von bis zu 2 % Arabinose induziert werden.

### 2.3.9 DNA-Sequenzierung

Die Basenrichtigkeit der durch eine Klonierung eingebrachten DNA-Fragmente wurde basierend auf der Methode von Sanger *et al.* (1977) überprüft. Die Sequenzierung erfolgte über automatisierte Sequenziergeräte (Applied Biosystems) durch die Firma Agowa (Berlin). 200 ng Plasmid-DNA oder 80 ng PCR-Fragment wurden mit einem Primer (10 pmol/ $\mu$ l) pro Reaktion zur Sequenzierung zu Agowa geschickt. Die Aufbereitung und die Analyse des Sequenzreaktionsansatzes wurden vom Sequenzierlabor durchgeführt. Die Dokumentation der DNA-Sequenzen erfolgte in Form von ABI-Files.

## 2.4 Analyse von DNA-Protein-Interaktionen

### 2.4.1 Konstruktion des *slyA*-Überexpressionsplasmids

Um das SlyA-Protein für weiterführende Analysen in größeren Mengen überproduzieren und aufreinigen zu können, wurden der Vektor pET28a zur Konstruktion und der *E. coli* Stamm BL21λDE3 zur Überexpression verwendet. pET28a besitzt einen starken T7-Promotor, der die Überexpression eines Proteins ermöglicht, wenn das Plasmid in einen *E. coli* Stamm transformiert wird, der die T7-RNA-Polymerase synthetisiert. Die kodierende Region des *slyA*-Gens wurde mit den Primern Nr. 505 und Nr. 506 (siehe Tab. 2.10) von chromosomaler DNA aus *E. coli* K-12 amplifiziert. Das so generierte, 460 bp lange Fragment wurde mit *NheI* und *XhoI* geschnitten und mit dem ebenso behandelten, zusätzlich dephosphorylierten Überexpressionsvektor ligiert. Dabei wurde das SlyA-Protein am N-terminus mit einem Hexapeptid der Aminosäure Histidin fusioniert. Diese Fusion ermöglichte eine spätere Aufreinigung des Fusionsproteins über Ni-NTA Affinitätschromatographie. Der sogenannte His-Tag bindet dabei spezifisch an das Säulenmaterial Ni<sup>2+</sup>-NTA. Die Ni<sup>2+</sup>-Ionen sind in einem Komplex mit dem Trägermaterial und Wasser-Molekülen gebunden. Die Wasser-Moleküle können durch Histidin verdrängt werden, wodurch ein sehr stabiler Chelat-Komplex gebildet wird. Die Elution des Fusionsproteins erfolgt mit Imidazol, das das Histidin des Proteins kompetitiv aus dem Chelat-Komplex verdrängt.

### 2.4.2 Überexpression und Reinigung des SlyA-Proteins

1 l LB Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurde mit einer 20 ml-Vorkultur von BL21λDE3 pET-28a-*slyA* (pAW24) 1:100 inokuliert, im Schikanekolben schüttelnd bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,7 wachsen gelassen und eine Probe entnommen. Im restlichen Volumen wurde die Protein-Expression durch Zugabe von 2 mM IPTG induziert. Nach 2 h weiterer Inkubation wurde eine weitere Probe genommen und die Zellen durch 15minütige Zentrifugation bei 6000 rpm in einem gekühltem GS3-Rotor geerntet (Sorvall RC5C Zentrifuge). Die Zellpellets wurden entweder direkt aufgeschlossen oder bis zum Zellaufschluss bei -20 °C gelagert. Zur Überprüfung der SlyA-Proteinüberexpression wurden Ganzzellextrakte der uninduzierten und induzierten Probe hergestellt und in einem 15%igem SDS-PAGE Gel analysiert.

Für den Zellaufschluss wurden die Zellpellets 15 min auf Eis inkubiert und anschließend in 2 bis 5 ml Lysispuffer pro Gramm Nassgewicht resuspendiert. Eine Proteaseinhibitormix-Tablette (Mini Complete, Roche) wurde in der Suspension gelöst. Die Bakteriensuspension wurde in zwei Durchgängen in einer French<sup>®</sup> Press-Druckentspannungs-Anlage (bei 16.000-

20.000 psi, Aminco) bei 4°C aufgeschlossen und das Lysat bei 11.000 rpm im gekühltem SS34-Rotor 20 min bei 4°C abzentrifugiert.

Das SlyA-Protein wurde, von leichten Modifikationen abgesehen, entsprechend den Anweisungen des „QIAexpressionist“ Kits bei 4°C aufgereinigt. Je 4 ml Überstand aus dem Zellaufschluss wurden mit 1 ml 50 % Ni-NTA versetzt und unter leichten Rotationen 1 h bei 4°C inkubiert. Das Lysat-Gemisch wurde auf eine Econo-Säule (50 ml Volumen, BioRad) gegeben und mit vier Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen. Sowohl vom Durchfluss als auch den vier Waschfraktionen wurden Proben für eine spätere Analyse aufgefangen. Das gebundene Protein wurde mit 20 ml Elutionspuffer eluiert und in Fraktionen à 2 ml aufgefangen. Von den eluierten Proteinfractionen wurden ebenfalls Proben entnommen und mit den Durchfluss- und Waschfraktionen gemeinsam durch ein 15 %iges SDS-PAGE Gel hinsichtlich Proteingehalt und Reinheit analysiert.

<b>Lysisbuffer:</b>	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; pH 8,0
<b>Waschpuffer:</b>	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 40 mM Imidazol; pH 8,0
<b>Elutionspuffer:</b>	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol; pH 8,0

### 2.4.3 Native Gelretardationsexperimente

Zum Nachweis von Protein-DNA-Wechselwirkungen *in vitro* wurden Gelretardations-Experimente (Bandshift-Analyse / Electromobility Shift Assay [EMSA]) durchgeführt. Dabei wird ein DNA-Fragment mit Proteinextrakten inkubiert und gegebenenfalls entstandene Protein-DNA-Komplexe anschließend in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die hochmolekularen Protein-DNA-Komplexe zeigen eine geringere Laufgeschwindigkeit im Gel als die freie, ungebundene DNA, so dass neben dem Signal des nicht komplexierten DNA-Fragmentes eine zusätzliche Bande auftritt, der sog. "Shift". Die Spezifität eines Protein-DNA-Komplexes kann anhand von Kompetitionsexperimenten nachgewiesen werden. Hierzu wird der Inkubationslösung zusätzlich ein unspezifisches Fragment als Kompetitor zugesetzt, das nicht durch das zu untersuchende Protein erkannt wird. Wenn das untersuchte Protein keine oder nur geringfügig höhere Bindeaffinität zur Kontroll-DNA als zur Kompetitor-DNA besitzt, kommt es zu keinem spezifischen Bandshift, weil bei sehr hohen Proteinkonzentrationen auch das Kompetitor Fragment unspezifisch „geshiftet“ wird.

Je nach Experiment wurden verschiedene DNA-Fragmente mit SlyA-Protein inkubiert und in einem 4%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Für den Nachweis einer direkten Interaktion von SlyA mit seinem eigenen Promotor und den als SlyA-abhängig identifizierten Genen *evgA*, *gadA* und *fliA* wurden verschieden große DNA-Fragmente (250 bis 600 bp) der

jeweiligen regulatorischen Regionen mit geeigneten Primern amplifiziert, gereinigt und äquimolare Mengen in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Als Kompetitor wurden jedem Ansatz entsprechend der Größe des zu testenden DNA-Fragmentes verschieden große Promotor-Fragmente der Gene *invasin (inv)* aus *Yersinia* und *csiD* aus *E. coli* zugegeben. Die DNA-Fragmente wurden mit ansteigender Menge des SlyA-Proteins (4 bis 200 ng) inkubiert. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe des Proteins in 1x DNA-Bindepuffer mit BSA hergestellt. In einem Kontrollansatz wurde anstelle der Proteinverdünnung 1x DNA-Bindepuffer eingesetzt. Alle Reaktionsansätze wurden in einem 20 µl Endvolumen in 1x DNA-Bindepuffer mit BSA angesetzt und für 20 min bei RT inkubiert. Die einzelnen Bindungsreaktionen wurden in nativen 4 % Polyacrylamidgelen in 0,5x TBE-Puffer für 75 bis 150 min bei 70 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard wurde ein 100 bp DNA-Marker (Roth) verwendet. Die Analyse und Fotografierung erfolgte nach Färben in einem Ethidiumbromidbad durch Exposition der Gele unter UV-Licht in einer Geldokumentationsanlage. Verwendete Primer sind der Tab. 2.11 zu entnehmen, ihre Sequenzen der Tab. 2.10.

**1x DNA-Bindepuffer:** 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0; 10 mM NaCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM DTT; 5 % Glyzerin in H<sub>2</sub>O Millipore

Tab. 2.11: Verwendete Promotor- und Kontroll-Fragmente

Promotorfragment	Amplifizierungs-Primer für das Promotorfragment	Fragmentgröße des Promotorfragments	Größe und Amplifizierungs-Primer des Kompetitors
<i>slyA</i> (-692 bis -275)*	Primer 162/I56	417 bp	<i>csiD</i> Primer 130/133; 369 bp
<i>slyA</i> (-505 bis +59)*	Primer 781/I60	564 bp	<i>inv</i> Primer 362/363; 477 bp
<i>slyA</i> (-148 bis +420)*	Primer I313/252	568 bp	<i>csiD</i> Primer 132/133; 245 bp
<i>slyA</i> (-65 bis +246)*	Primer I314/I334	311 bp	<i>csiD</i> Primer 130/131; 237 bp
<i>slyA</i> (-16 bis +246)*	Primer I315/I334	262 bp	<i>csiD</i> Primer 131/132; 113 bp
<i>evgA</i> (-527 bis +85)**	Primer I43/I44	612 bp	<i>csiD</i> Primer 132/133; 245 bp
<i>gadA</i> (-478 bis +22)**	Primer I61/I62	500 bp	<i>csiD</i> Primer 132/133; 245 bp

<i>fliA</i> (-497 bis +12)**	Primer I388/I389	510 bp	<i>csiD</i> Primer 132/133; 245 bp
---------------------------------	------------------	--------	---------------------------------------

\*Position relativ zum Transkriptionsstart P1

\*\*Position relativ zum Translationsstart

#### 2.4.4 Nichtradioaktive DNaseI Footprint-Analyse

Zur Identifizierung der Bindungsstellen des Transkriptionsregulators SlyA in seinem eigenen Promotorbereich wurden DNaseI Footprint-Analysen durchgeführt. Die Bindestelle des Proteins erscheint dabei als ein blanker Bereich, der den vor dem DNaseI Abbau geschützten Bereich der DNA-Sonden markiert. Die DNaseI-Konzentration wird dabei so gewählt, dass das Fragment in möglichst unterschiedlich lange Stücke geschnitten wird.

Die DNaseI Footprint-Experimente wurden nach Lucht *et al.* (1994) in modifizierter Form durchgeführt. Zur Herstellung der DNA-Sonden wurde die *slyA*-Promotorregion zunächst in einer PCR mit unmarkierten Oligonukleotiden amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend als Template für eine zweite PCR eingesetzt, bei der ein Primer am 5'-Ende eine Digoxigenin-Markierung trug. Durch einen Testverdau wurde zunächst die optimale DNaseI Verdünnung für jede Sonde bestimmt. Für den eigentlichen Protektions-Assay wurden in einem 20 µl Reaktionsansatz 2 – 5 µl der 5'-DIG-markierten Promotor-Fragmente mit aufsteigender SlyA-Proteinkonzentration (von 0,1 bis 9 µM SlyA) für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle wurde einem Ansatz kein Protein zugegeben. Anschließend wurden 5 µl DNase I zu jedem Ansatz gegeben und die Sonde genau 20 sec lang partiell fragmentiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl DNaseI Stopp-Lösung gestoppt. Zu allen Ansätzen wurde 50 µl CPI (Chloroform:Phenol:Isoamylalkohol 25:24:1) gegeben, gemischt und für 10 min bei maximaler Beschleunigung in einer Tischzentrifuge (Mini Spin, Eppendorff) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß zu 25 µl 10 M Ammoniumacetat gegeben und mit 2 µl Glykogen gemischt. Anschließend wurde die DNA nach Zugabe von 300 µl eiskaltem 99 %igem Ethanol für 30 min bei -20°C gefällt und durch 20minütige Zentrifugation bei 4°C präzipitiert. Nach einem Waschschrift mit 500 µl 70 % eiskaltem Ethanol und erneuter Sedimentation wurde das Pellet luftgetrocknet, in 4 µl Probenpuffer (Stopp-Lösung aus dem Sequenase Sequencing Kit) resuspendiert und bei -20°C eingefroren. Vor der Auftrennung in einem 6 %igen Sequenziergel wurden die Proben bei 85°C für 3 min erhitzt. Die Elektrophorese wurde bei 3000 V, 150 mA und 60 W in einer Senkrecht-Elektrophoreseapparatur (S2001, Invitrogen) in 1 x TBE durchgeführt. Eine der verwendeten Glasplatten wurde auf der Innenseite mit einer Silan-Schicht bedeckt. Die Sequenzzuordnung des geschützten Bereiches erfolgte mittels einer parallel aufgetragenen Sequenzierungsreaktion (siehe 2.4.5).

<b>10x TBE-Puffer:</b>	108 g Tris Base; 55 g Borsäure; 20 mM EDTA pH 8,0; ad 1 l mit H <sub>2</sub> O Millipore
<b>5x DNase I Puffer:</b>	10 mM Tris-HCl pH 7,8; 12,5 mM CaCl <sub>2</sub> ; 15 mM MgCl <sub>2</sub> ; 200 mM NaCl; 1 mM DTT (Lagerung der Aliquots bei -20 °C)
<b>DNase I Stopp-Lösung:</b>	15 mM EDTA; 10 µg/yeast carrier tRNA; Lagerung bei 2-8 °C

Tab. 2.12: Oligonukleotide zur DNaseI Footprint-Analyse

DIG-markierter Amplifizierungs- und Sequenzierungs-Primer	Unmarkierter Amplifizierungs-Primer	Größe der DNA Sonde
Primer I70	Primer I84	321 bp
Primer I71	Primer I60	351 bp
Primer I273	Primer 443	389 bp
Primer I347	Primer 443	480 bp

#### 6 % Sequenziergel

42 g 7 M Harnstoff  
 10 ml 10x TBE  
 15 ml 40 % Acryl/Bisacrylamid  
 500 µl 10 % APS  
 50 µl TEMED  
 à 100 ml H<sub>2</sub>O (Millipore)

#### 2.4.5 Herstellung von DIG-markierten Sequenzreaktionen

Für die Herstellung der in 2.4.4 verwendeten Sequenzierungsreaktionen wurde das der Sonde entsprechende, unmarkierte PCR-Produkt als Matrize eingesetzt und das zugehörige DIG-markierte Oligonukleotid als Primer.

Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode/Didesoxymethode (Sanger *et al.*, 1977) mit dem Sequenase DNA Sequencing Kit (USB) nach Angaben des Herstellers. Es wurde ein Mastermix bestehend aus 1 µg DNA-Matrize, 2 µl Reaktionspuffer, 1 µl DIG-markiertem Primer (Endkonzentration 180 pmol) und 2 µl Thermo Sequenase DNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 17,5 µl angesetzt und je 4 µl davon zu 4 µl ddATP, ddGTP, ddTTP und ddCTP Terminationsmix gegeben. Die Sequenzreaktion erfolgte im Thermocycler in drei Schritten, die 40- bis 60-mal wiederholt wurden: (1) 30 sec bei 95 °C, (2) 30 sec bei 58 °C und (3) 40 sec bei 72 °C. Anschließend wurde die Reaktion durch die

Zugabe von 4 µl Stopp-Lösung abgebrochen und die Ansätze bei -20 °C aufbewahrt. Vor der Auftrennung in einem 6 %igen Sequenziergel wurden die Sequenzreaktionen bei 75 °C für 2 min erhitzt.

### 2.4.6 Kapillarblot zum DNA-Transfer

Für den Transfer der DNA aus den 6 %igen Sequenziergelen auf eine Nylonmembran („NytranN“) wurde ein Kapillarblot durchgeführt. Das Gel blieb dabei auf der nicht-silanisierten Glasplatte haften, und darauf wurden in der Reihenfolge von unten nach oben frische Nylonmembran, wieder verwendete Nylonmembran und 6 Lagen Blotting-Filterpapiere geschichtet. Die zweite (silanisierte) Glasplatte wurde zum Beschweren oben aufgelegt. Die Übertragung der DNA auf die Nylonmembran erfolgte bei Raumtemperatur via Kapillarkraft für zwei Stunden. Anschließend wurde die DNA durch 3minütige UV-Bestrahlung in einem Crosslinker-Gerät (UV-Stratalinker™ 2400, Stratagene) auf der Membran fixiert. Die Membran wurde entweder zwischen zwei Filterpapieren getrocknet und aufbewahrt oder mit der Immundetektion der DIG-markierten DNA (siehe 2.4.7) fortgefahren.

### 2.4.7 Detektion von DIG-markierter DNA

Vor der eigentlichen Detektion wurde die Membran kurz in Waschpuffer eingelegt und unspezifische Bindestellen für 30 min schüttelnd in 1x Blockierungslösung abgesättigt. Die DIG-markierten DNA-Fragmente wurden mittels eines monoklonalen, spezifisch gegen DIG gerichteten Antikörpers (Roche), der mit Alkalischer Phosphatase konjugiert war, detektiert. Alkalische Phosphatase setzt das Chemolumineszenz-Substrat CDP-*Star* (Roche) um. Die enzymatische Dephosphorylierung des CDP-*Star* durch die Alkalische Phosphatase führt dabei zur Bildung eines metastabilen Dioxetan Phenolat-Anions, welches zerfällt und Licht der Wellenlänge 466 nm emittiert. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte in 1:6000facher Verdünnung in 1x Blockierungslösung. Anschließend wurde die Membran zweimal für je 15 min in Waschpuffer gewaschen und kurz in Detektionspuffer equilibriert. Das CDP-*Star* Substrat wurde in 1:100facher Verdünnung in Detektionspuffer zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen der überschüssigen CDP-*Star*-Lösung wurde die Membran für 3 bis 7 min mit einem Hyperfilm (CL-Xposure™ Film, Pierce) in einer Fotofilmkassette exponiert. Der Röntgenfilm wurde in einer Entwicklermaschine (Optimax Typ TR, MS Laborgeräte) automatisch entwickelt. Zur Bearbeitung wurden die fertigen Röntgenfilme eingescannt und als TIF-Dateien gespeichert.

<b>Waschpuffer:</b>	0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; pH 7,5; 0,3 % Tween 20
<b>Maleinsäurepuffer:</b>	0,1 M Maleinsäure; 0,15 mM NaCl; pH 7,5
<b>10x Blockierungslösung:</b>	10 % Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer, autoklaviert
<b>1x Blockierungslösung:</b>	1:10 verdünnt in Maleinsäurepuffer
<b>Detektionspuffer:</b>	0,1 M Tris-HCl pH 9,5; 0,1 M NaCl

## 2.5 Genexpressionsanalysen

### 2.5.1 Beta-Galaktosidase Aktivitätstest

Die  $\beta$ -Galactosidase ist ein homotetrameres Enzym aus *E. coli* mit einer Masse von 116 kDa pro Untereinheit. Sie wird vom *lacZ*-Gen kodiert und katalysiert die Hydrolyse von  $\beta$ -Galactosiden. Das natürliche Substrat der  $\beta$ -Galactosidase ist das Disaccharid Laktose. Die beiden synthetischen Laktosederivate ONPG (Ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid) und X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) werden als chromogene Substrate für die  $\beta$ -Galactosidase benutzt, wobei ONPG zur quantitativen Bestimmung ihrer Aktivität verwendet wird und X-Gal zur qualitativen. Durch hydrolytische Spaltung des farblosen ONPG entstehen Galaktose und das gelbgefärbte o-Nitrophenol. Die Intensität der Gelbfärbung ist von der Konzentration der  $\beta$ -Galaktosidase und der Reaktionsdauer abhängig. Durch Zugabe von Natriumcarbonat verschiebt sich der pH-Wert in den basischen Bereich (pH 11), wodurch die Reaktion abgestoppt wird, da die  $\beta$ -Galaktosidase bei hohen pH-Werten inaktiv ist.

Die Menge des entstandenen o-Nitrophenols kann photometrisch anhand der Absorption bei 420 nm bestimmt werden. Aus der Reaktionsdauer und dem Absorptionswert lässt sich die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität berechnen.

X-Gal wird von der  $\beta$ -Galactosidase zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl hydrolysiert. Das 5-Brom-4-chlor-indoxyl wird vom Sauerstoff der Luft zum tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert. Es wird daher in einem sogenannten „blau-weiß-screening“ verwendet und zu diesem Zweck Festmedien zugesetzt.

Zur Ermittlung der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (Miller *et al.*, 1992; Lucht, 1989) wurden Übernachtskulturen von Stämmen angesetzt, die eine Plasmid- oder chromosomal-kodierte *lacZ*-Reportergenfusion trugen. Die Kulturen wurden auf eine OD<sub>600</sub> nm zwischen 0,01 und 0,9 verdünnt und 2x 200  $\mu$ l der Verdünnung zur Doppelbestimmung in je ein Glasröhrchen überführt. Durch Zugabe von zwei Tropfen 0,1 % SDS und Chloroform, starkes



Mischen und zehnminütige Inkubation bei RT wurden die Zellen aufgeschlossen. Die optische Dichte der Proben bei 600 nm wurde photometrisch bestimmt und 2x 500 µl der Suspension zur Doppelbestimmung in je ein Glasröhrchen überführt. Nach Zugabe von 1,8 ml 1x Z-Puffer wurde die Enzymreaktion durch 400 µl des Substrates ONPG (4 mg/ml in H<sub>2</sub>O) gestartet. Nach Eintreten der Gelbfärbung wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Natriumcarbonat (1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) abgebrochen. Nach kurzer Sedimentation bei Maximalgeschwindigkeit wurde im Microplate-reader die optische Dichte des Überstandes bei 405 nm bestimmt.

Die spezifische Enzymaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{spezif. Aktivität} = OD_{405\text{nm}} \cdot 6,75 \cdot (OD_{600\text{nm}} \cdot \Delta t \cdot V)^{-1}$$

OD <sub>405nm</sub> =	optische Dichte des Reaktionsansatzes nach beendeter Reaktion
6,75 =	Extinktionskoeffizient des gespaltenen ONPG in µmol/min/mg Protein
OD <sub>600nm</sub> =	optische Dichte der Bakterienkultur
V =	eingesetztes Kulturvolumen in ml
spezif. Aktivität =	Einheit: (µmol gespaltenes Substrat)(min) <sup>-1</sup> (mg Protein) <sup>-1</sup> oder Units (U)(mg Protein)
Δt =	Zeitraum zwischen dem Start (Zugabe von ONPG) und Stoppen (Zugabe von Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) der Enzymreaktion

**Z-Puffer:** 100 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0; 10 mM KCl; 1 mM MgSO<sub>4</sub>

### 2.5.2 Konstruktion der Plasmid-kodierten Reportergenfusionen pAW13, 15, 16 und pKAB5, 6, 7 und 8

Zur quantitativen Untersuchung der Genexpression und -regulation der *slyA*-Gene verschiedener *E. coli* Stämme wurden β-Galaktosidase Aktivitätstests (siehe 2.5.1) eingesetzt. Darüber hinaus sollte die Autoregulation des *slyA*-Gens anhand von Promotor-Deletionsanalysen untersucht werden. Dazu wurden transkriptionale *slyA-lacZ* Fusionen der jeweiligen *slyA*-Promotoren konstruiert. Die regulatorischen Regionen der *slyA*-Gene aus CC118λpir, EPEC und EIEC wurden mittels der Primer 162 und 252 von chromosomaler DNA amplifiziert und mit Hilfe des PCR-Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt. Die 1,112 kb großen Fragmente wurden mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten und in den ebenso

linearisierten und dephosphorylierten *lacZ*-Fusions-Vektor pJL28 ligiert. Für die Promotor-Deletionsanalyse wurden folgende Konstrukte generiert: pKAB5 (Primer 162/252); pKAB6 (Primer 781/252); pKAB7 (Primer 783/252); pKAB8 (Primer I313/252) und pKAB9 (Primer I314/252). Die unterschiedlich langen Fragmente des *slyA*-Promotors wurden von chromosomaler DNA aus *E. coli* K-12 amplifiziert und mit Hilfe des PCR-Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt. Die Fragmente wie auch der Vektor pJL28 wurden mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten und ligiert. Anschließend wurden die *slyA-lacZ* Konstrukte aus pJL28 in den "low-copy" Vektor pHSG575 umklontiert, wie unter 2.5.3 beschrieben.

### 2.5.3 Konstruktion der *slyA'*-Reportergenfusionen im low-copy Vektor pHSG575

Die auf den Plasmiden pAW20 (*slyA'*<sub>CC118 $\lambda$ pir</sub>), pAW21 (*slyA'*<sub>EPEC</sub>) und pAW22 (*slyA'*<sub>EIEC</sub>) kodierten *slyA-lacZ*-Fusionen entsprechen denen von pAW14, pAW15 und pAW16. Sie wurden in den "low-copy"-Vektor pHSG575 eingebracht. Dazu wurde der Vektor mit *Sma*I verdaut, die Fragmente wurden aus den Plasmiden pAW13, pAW15 und pAW16 mit *Sma*I und *Dra*I mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) ausgeschnitten und in den Vektor ligiert.

### 2.5.4 Konstruktion der *gadA'*- und *evgA'*-Reportergenfusionen im low-copy Vektor pGP20

Um die Expression der Gene *gadA*, *clyA* und *evgA* in Abhängigkeit von SlyA und anderen Faktoren untersuchen zu können, wurden sie in den "low-copy"-Vektor pGP20 (Tc<sup>R</sup>) eingebracht und mit dem Reportergen *lacZ* fusioniert, das dieser Vektor kodiert. Zur Konstruktion von pAW31 (pGP20-*gadA'*) wurde der Vektor mit *Eco*RI linearisiert und dephosphoryliert, das 624 bp lange *gadA'* Fragment wurde mit den Primern 846 und 894 von chromosomaler DNA aus *E. coli* K-12 amplifiziert und ebenfalls mit *Eco*RI geschnitten und in den Vektor ligiert. Die Transformanten mit korrekt integrierten Inserts konnten aufgrund der blauen Koloniefarbe identifiziert werden, da die *lacZ*-Sequenz in pGP20 wie in pJL28 erst am achten Codon beginnt und nur durch die Fusion mit einem Promotor und Translationsstart exprimiert wird. Zur Konstruktion von pAW34 (pGP20-*evgA'*) wurde das 611 bp lange *evgA'* Fragment mit den Primern I43 und I44 von chromosomaler DNA aus *E. coli* K-12 amplifiziert und Vektor und Insert mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten. Anschließend wurde das Fragment an das *lacZ*-Gen in pGP20 fusioniert. Das 550 bp lange *clyA'*-Promotorfragment wurde mit den Primern I488 und 599 amplifiziert und wie auch der Vektor mit *Eco*RI und *Pst*I geschnitten. Vektor und Insert wurden wie vorher beschrieben fusioniert. Alle PCR-

generierten Fragmente wurden vor dem Verdau mittels PCR-Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt.

### 2.5.5 Isolation von RNA

RNA wurde mit Hilfe des SV Total RNA-Isolation Kits (Promega) nach Angaben des Herstellers isoliert. Aus einer *E. coli* Vorkultur wurden 20 ml Medium im Verhältnis 1:100 beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 1,5 und 2 (frühe stationäre Phase) bei 37°C schüttelnd kultiviert. 5 ml der Proben wurden für 2 min bei Maximalgeschwindigkeit sedimentiert und das Pellet in 1 ml Stop-Solution (5% Phenol, 95% reinst-EtOH) resuspendiert. Die Suspension wurde für 10-20 sec in flüssigem Stickstoff eingefroren und auf Eis aufgetaut. Zur Entfernung des Phenols wurde die Kultur bei 4°C für 2 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl Lysozym-TE-Puffer resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurden 50 µl Lysisreagenz und 350 µl RNA dilution Puffer zugegeben. Die Suspension wurde für 3 min auf 70°C erhitzt, bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit 200 µl EtOH gemischt und auf ein RNeasy-Säulchen gegeben. Nach einem Waschschrift mit 600 µl Waschpuffer erfolgte die 15 minütige DNaseI Behandlung bei RT auf der Säule mit frisch angesetztem DNase Mix. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl DNase Stop Mix abgebrochen und zwei weitere Waschschriffe mit 600 und 250 µl Waschpuffer durchgeführt. Die RNA wurde in RNase-freiem Wasser eluiert und sofort weiterverwendet oder bei -80°C gelagert.

#### **DNase-Mix**

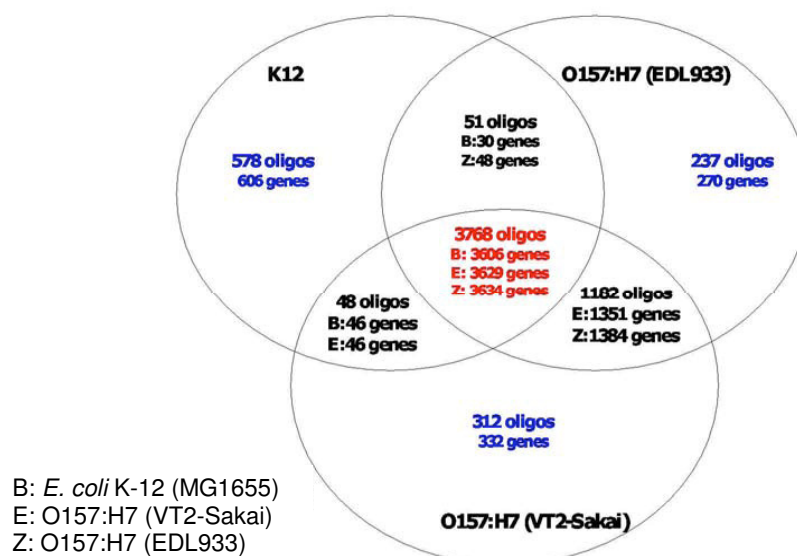
- 5 µl DNase (Lagerung der Aliquots bei -20°C)
- 40 µl DNase core buffer
- 5 µl 90 mM MnCl<sub>2</sub>

### 2.5.6 DNA-Chip-Analyse

Der in dieser Arbeit verwendete *Escherichia coli* K-12 V2 OciChip™ (Ocimum Biosolutions) enthält 4288 genspezifische Oligonukleotidproben, die das gesamte *E. coli* K-12 Genom repräsentieren. Dadurch ist es möglich, die Expression sämtlicher Gene simultan in einem einzigen Hybridisierungs-Experiment zu analysieren. Bei den Proben handelt es sich um 50-mere. Der ebenfalls verwendete *E. coli* O157 OciChip™ ist ein Hybrid-Array, der drei

verschiedene *E. coli* Stämme zusammenfasst. Der Array enthält 4288 für *E. coli* K-12 (MG1655), 5336 für *E. coli* O157:H7 (EDL 933) und 5358 für *E. coli* O157:H7 (RIMD0509952/VT2-Sakai) spezifische Gene, die durch 6176 50-mere Oligos abgedeckt werden. Oligonukleotide, die für *E. coli* K-12 spezifisch sind, sind durch das Acronym B gekennzeichnet, für *E. coli* O157:H7 RIMD0509952/VT2-Sakai spezifische durch E und für *E. coli* O157:H7 EDL 933 durch Z.

Die Chips wurden unter Verwendung der Software Oligos4Array produziert, wobei für jedes Gen eine 50-mere Oligonukleotidprobe generiert wurde. Ein mit einer Pipettierhilfe ausgestattetes Computer-gesteuertes Robotersystem trägt anschließend kleine Mengen (im nl Bereich) der amplifizierten *E. coli* Gene nacheinander auf die Glasoberflächen der Objektträger auf, an der sie kovalent binden.



**Abb. 2.1: Oligonukleotid-Spezifitäten für die *E. coli* Stämme (Ocimum Biosolutions Manual)**

#### 2.5.6.1 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden

Für den genomweiten Vergleich der Genexpressionsmuster zweier verschiedener RNA Proben wurden fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden synthetisiert. Die cDNA wurde während der reversen Transkription durch Inkorporation von Fluoreszenz-markierten Nukleotiden nach dem Protokoll von Ocimum Biosolutions markiert. Zu 6 µl RNA (50 µg) wurden 3 µl pdN6 Zufalls-Hexanukleotid-Primer (3 µg/µl, Invitrogen) gegeben und der Reaktionsansatz für 10 min auf 65°C erhitzt und anschließend für weitere 10 min bei RT inkubiert. Nachdem der Ansatz für 2 min abgekühlt worden war, wurde die RNA revers transkribiert und

während- dessen durch Einbau von entweder rot (Cy5) oder grün (Cy3) Fluoreszenz-markierten dTTP-Analoga gekennzeichnet.

Dazu wurden folgende Reagenzien gegeben:

Reagenz	Volumen (50 µg RNA)
5x RT reaction buffer (Superscript II Kit, Invitrogen)	4 µl
dNTP Mix: 5 µl 100 mM dATP 2 µl 100 mM dTTP 5 µl 100 mM dGTP 5 µl 100 mM dCTP	2 µl
83 µl Nuklease-freies Wasser (Superscript II Kit, Invitrogen)	
Cy3-dTTP, bzw. Cy5-dTTP (1 mM)	2 µl
0,1 M DTT	2 µl
Superscript II (200 U, Invitrogen)	1 µl

Die Reaktion wurde für zwei Stunden bei 42°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 5 µl 1 M NaOH und zehnminütiges Erhitzen auf 65°C abgebrochen und restliche RNA hydrolysiert. Die Lösung wurde daraufhin mit 5 µl HCl und 200 µl TE-Puffer (pH 7,5) neutralisiert. Zur Entfernung nicht-inkorporierter dNTPs, sowie pdN6 Zufalls-Hexanukleotid-Primern wurde das PCR Purification Kit (Qiagen) verwendet und die markierte cDNA mit Nuklease-freiem Wasser (Superscript II Kit, Invitrogen) eluiert.

1 µl der Probe wurde abgenommen und die cDNA Konzentration photometrisch bestimmt. Gleiche Mengen beider cDNA Proben (Cy3- und Cy5-markiert) wurden vereinigt und bis zur fast vollständigen Trockenheit evaporiert. Die markierten Proben konnten bei -20°C zwei Tage lang gelagert werden oder wurden sofort weiter verwendet.

#### 2.5.6.2 Hybridisierung

Der Hybridisierungspuffer (Ocimum Biosolutions) wurde zunächst für 10 min auf 42°C vorgewärmt. Die cDNA wurde in 100 µl des Puffers gelöst und diese Hybridisierungslösung für 3 min bei 95°C erhitzt und für maximal 3 min auf Eis abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Um eine gleichmäßige Verteilung der Probe zu gewährleisten, wurde vor dem Auftragen der Hybridisierungslösung ein Spezialrahmen (Ocimum Biosolutions) um den Bereich mit den Oligonukleotiden auf dem Objektträger befestigt und dieser nach dem Befüllen mit der Probe mit einer Klebefolie bedeckt. Um eine Austrocknung der Lösung während der Hybridisierung zu verhindern, wurde je ein Tropfen Wasser in zwei Vertiefungen am Rand der Hybridisierungskammer (Corning) gegeben. Der DNA-Chip wurde anschließend für 24

Stunden in einem Wasserbad sanft geschüttelt.

Um die Hybridisierungslösung und unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen, wurde der DNA-Chip jeweils 5 min in den auf 30°C vorgewärmten Waschpuffern 1 (2x SSC, 0,1 % SDS), 2 (1x SSC) und 3 (0,1x SSC) in Glasschalen bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert und durch Zentrifugation getrocknet. Anschließend wurde die Fluoreszenz auf der DNA-Chip-Oberfläche bestimmt.

**20x SSC-Puffer (pH7):** 3 M NaCl; 0,3 M Na<sub>3</sub>Citrat · 2 H<sub>2</sub>O

### 2.5.6.3 Scannen des DNA-Chips und Analyse der Daten

Zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel wurde die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz der Spots gemessen, die direkt mit der Menge gebundener, fluoreszenzmarkierter Sonde korreliert.

Die Auswertung erfolgte mit einem GenePix 4000 Laserscanner (Axon Inc.) und der GenePix Pro 3.0 Software (Axon Inc.). Der Laser-Scanner bestrahlt die Oberfläche der DNA-Chips mit monochromatischem Licht zweier unterschiedlicher Wellenlängen: zur Anregung von Cy3-dTTP mit 532 nm und zur Anregung von Cy5-dTTP mit 635 nm. Die emittierte Fluoreszenz von Cy3 bei 570 nm und von Cy5 bei 670 nm wurde von lichtempfindlichen Kathoden registriert und in einen elektrischen Strom umgewandelt, der direkt mit der Cy3- und Cy5-Fluoreszenz korreliert.

Mit Hilfe der GenePix Pro 3.0 Software wurde durch ein sogenanntes Gitter („Grid“) jedem fluoreszierenden Spot ein Gen in Form eines Kreises zugeordnet. Die Stärke der Hintergrund-Fluoreszenz wurde als Bereich außerhalb der Kreise des Grids ermittelt. Zur statistischen Absicherung wurde das Experiment mehrfach wiederholt. Die Analyse der Daten erfolgte mit dem Limma Paket von Bioconductor unter Nutzung des Programms CARMAweb (Comprehensive R-based Microarray Analysis web service), das unter <https://carmaweb.genome.tugraz.at/carma/> frei zugänglich ist (Rainer *et al.*, 2006). Zur Preprozessierung wurde die Hintergrund-Korrektur mit der normexp-Funktion durchgeführt, für die Normalisierung innerhalb eines Arrays wurde die print-tip Loess-Methode verwendet und für die Normalisierung zwischen den Arrays die Quantil-Methode. Zur Detektion von differentiell exprimierten Genen wurde der Student's *t*-test durchgeführt (Rainer *et al.*, 2006). Dabei wurden die Werte aus mind. 5 unabhängigen Experimenten gemittelt und die Standardabweichung sowie der Anteil der Standardabweichung am Gesamtwert in Prozent berechnet.

Für die weitergehende Untersuchung wurden Gene mit statistisch signifikantem, mindestens 1,5fach verändertem Expressionsprofil herausgefiltert.

### 2.5.7 Primer-Extension

Zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes und Quantifizierung des relativen mRNA-Spiegels des *slyA*-Gens in *E. coli* K-12 und EIEC wurden Primer-Extension-Experimente durchgeführt.

Zunächst wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl 20-40 µg Gesamt-RNA mit 0,5 µM des DIG-markierten Primers und 4 µl des 5x First Strand Puffers von Invitrogen gemischt. Der Ansatz wurde für 10 min auf 80 °C erhitzt, um RNA-Sekundärstrukturen zu denaturieren, und dann zur Anlagerung der Oligonukleotide im Thermocycler langsam im Verlauf von zwei Stunden auf 42 °C abgekühlt.

Zur Synthese des komplementären cDNA-Stranges wurde ein Gemisch aus 2,5 µl 8 mM dNTPs (Fermentas) und 1 µl SuperscriptII Reverse Transkriptase (10 U/µl, Invitrogen) zum Ansatz gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 42 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 175 µl TES-Puffer und 200 µl CPI gestoppt. Anschließend wurde die DNA im Überstand nach fünfminütiger Zentrifugation durch Zugabe von 500 µl eiskaltem EtOH für 30 min bei -70 °C gefällt. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 4 µl Stop-Lösung aus dem Sequenase DNA Sequencing Kit (USB) resuspendiert und entweder sofort mit einem 6%igen Sequenziergel analysiert wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben oder bei -20 °C aufbewahrt. Die Länge des Reaktionsproduktes und somit der Transkriptionsstart wurden durch gleichzeitiges Auftragen einer DNA-Sequenzierungsreaktion (siehe 2.4.5) bestimmt, die mit demselben markierten Oligonukleotid durchgeführt wurde, das auch für die reverse Transkriptions-Reaktion eingesetzt wurde.

**TES-Puffer:** 10 mM Tris-HCl pH7,5; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl

## 2.6 Biochemische Methoden

### 2.6.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung komplexer Proteingemische nach ihrer Größe und ermöglicht die Bestimmung des Molekulargewichtes. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz und überdeckt die Eigenladung von Proteinen so effektiv, dass die Proteine eine konstant verteilte negative Ladung aufweisen (1,4 g SDS pro 1 g Protein). Dadurch wird gewährleistet, dass nur die Größe des Proteins als Trennkriterium wirkt. Der SDS-Protein-Komplex wandert im elektrischen Feld zum Plus-Pol. Bei der Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuss von SDS auf 95 °C erhitzt, um so die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der

Wasserstoffbrücken und Streckung der Moleküle aufzulösen. Disulfidbrücken zwischen Cysteinen können durch Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung zum Probenpuffer wie z.B.  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) aufgespalten werden. Am Ende dieser Präparation weisen die mit SDS beladenden Proteine eine ellipsoide Form auf. Die Elektrophorese erfolgt in einem diskontinuierlichen Puffersystem nach Lämmli (1970). Ein großporiges Sammelgel (4 % Acrylamid, pH 6.8) überschichtet dabei ein feinmaschiges Trenngel (15 % Acrylamid, pH 8,8). Aufgrund der größeren Poren und des anderen pH-Wertes des Sammelgels wandern die Proteine schnell und ohne Auftrennung als scharfe Bande in einem Gebiet hoher Feldstärke. Beim Auftreffen auf das Trenngel erfahren die Proteine einen hohen Reibungswiderstand und ihre Geschwindigkeit verringert sich drastisch, was zur weiteren Zonenschärfung führt. Im Trenngel wirkt auf alle Proteine die gleiche Feldstärke und ausschließlich die Größe ist für die Wandergeschwindigkeit ausschlaggebend. APS (Ammoniumpersulfat) bildet im Wasser freie Radikale ( $\text{SO}_4$ ), die mit Acrylamid reagieren und dient so als Katalysator für die Polymerisation des Acrylamids. TEMED (N,N,N,N,-Tetramethylethyldiamin) dient ebenfalls als Katalysator der Polymerisation, indem es die Radikalbildung des APS erleichtert.

Die Proteinbanden können nach erfolgter Trennung direkt im Gel gefärbt werden. Am häufigsten wird dazu der anionische Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue verwendet, der an hydrophobe Bereiche der Proteine bindet und diese somit sichtbar macht. Gleichzeitig mit dem Färben werden die Proteine auch durch eine Ethanol/Essigsäure/Wasser Mischung im Gel fixiert.

Zur Gewinnung von Ganzzellextrakten wurden 1 ml Bakterienkultur durch Zentrifugation pelletiert, in 100  $\mu\text{l}$  1x SDS-Probenpuffer resuspendiert und bei 95°C für 5 min gekocht. Die Auftrennung erfolgte in einer Senkrecht-Elektrophoreseapparatur (Mini PROTEAN II, BioRad) bei 25 mA pro Gel. Zur Analyse wurden die Gele mit Coomassie-Färbelösung 1 h gefärbt und mit Entfärberlösung entfärbt, oder für eine Westernblot-Analyse (2.6.2) ungefärbt belassen.

<b>Trenngel:</b>	2,5 ml Trenngelpuffer (60,6 g Tris Base; 4 g SDS, Aqua bidest ad 1 l; pH 8,8); 5 ml Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid); 2,5 ml $\text{H}_2\text{O}$ ; 25 $\mu\text{l}$ TEMED; 25 $\mu\text{l}$ 10 % APS
<b>Sammelgel:</b>	2,5 ml Sammelgelpuffer (181,7g Tris Base; 4 g SDS, Aqua bidest ad 1l; pH 6.8); 1,1 ml Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid); 6,5 ml $\text{H}_2\text{O}$ ; 40 $\mu\text{l}$ TEMED; 80 $\mu\text{l}$ 10 % APS
<b>4x SDS-Probenpuffer:</b>	0,24 M Tris-HCl pH 6,8; 8 % SDS; 40 % Glycerin; 12 % DTT; 0,004 % Bromphenolblau
<b>Elektrophoresepuffer:</b>	20,25 g Tris Base; 72 g Glycin; 0,1 % SDS; Aqua dest ad 5 l



<b>Coomassie-Lösung:</b>	1,25 g Coomassie Brilliant G250; 225 ml Methanol; 50 ml Essigsäure; 225 ml Aqua dest
<b>Entfärberlösung:</b>	30 % Methanol; 10 % Essigsäure

### 2.6.2 Immunoblotanalyse (Westernblot)

Die Immunoblotanalyse nach Towbin *et al.* (1979) ist eine Methode, bei der elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf einen geeigneten Träger wie Nitrocellulose oder Nylon übertragen werden. Der Transfer erfolgt ebenfalls auf elektrophoretischem Weg, dabei wird ein elektrisches Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegt. Dabei wandern die Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulose- oder Nylon-Membran.

Die Proteine werden auf dem Filter immobilisiert und das Trennmuster der Protein-Moleküle bleibt nach der Übertragung erhalten, so dass eine exakte Kopie des Gels entsteht. Die Bindung der Moleküle an die Träger-Membran erfolgt über Wasserstoff-Brücken und hydrophobe Wechselwirkungen. Nach dem Transfer kann das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen werden, so dass die Proteine renaturieren können und ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen. Die Proteine können nun mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert werden. Auf diese Weise ist die Identifikation und Quantifizierung spezifischer Proteine in einem komplexen Proteingemisch möglich.

Die Bindung der Antikörper an die immobilisierten Proteine kann durch einen von Hawkes *et al.* entwickelten Immunotest nachgewiesen werden. Dabei bindet an einen spezifischen Primärantikörper ein Sekundärantikörper, der mit Enzymen (z.B. Peroxidase, alkalische Phosphatase,  $\beta$ -Galactosidase) gekoppelt ist. Nach der Zugabe eines Substrates kommt es zu einer spezifischen enzymatischen Farbreaktion des Enzyms und zur Bildung von Farbstoffpräzipitaten auf der Nitrocellulosemembran.

Der Transfer des SlyA- und RpoS-Proteins erfolgte mit einer Westernblotapparatur (BioRad) auf eine Immobilon-P Membran (PVDF 0,45  $\mu$ m; Millipore) bei konstanter Spannung von 100 V für 1 h. Die Transfermembran wurde zuvor in Methanol und Transblotpuffer inkubiert. Methanol dient dazu, das SDS aus dem Protein-Detergens Komplex zu entfernen und die Bindung an die Membran zu erhöhen. Anschließend wurden unspezifische Bindestellen der Membran über Nacht bei 4°C in TBSTM-Puffer blockiert. Der eingesetzte primäre, gegen SlyA bzw. RpoS gerichtete Antikörper ist ein aus Kaninchen gewonnenes polyklonales Antiserum und wurde von der Firma Davids Biotechnologie bezogen (anti-SlyA) bzw. von Frau Prof. Dr. Hengge zur Verfügung gestellt (anti-RpoS). Er wurde 1:1000 in TBSTM-Puffer verdünnt und für eine Stunde schwenkend mit der Membran inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimalig für je 10 min mit TBST-Puffer gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Antikörper verwendet, der

gegen Kaninchen gerichtet ist und daher den ersten Antikörper erkennt. (Anti-Kaninchen-AP aus der Ziege, Sigma). Der Sekundärantikörper wurde 1:8000 in TBSTM-Puffer verdünnt und für eine Stunde mit der Membran inkubiert. Die Membran wurde im Anschluss daran für jeweils 10 min mit TBST- und AP-Puffer gewaschen. Nach Zugabe der frisch angesetzten Färbelösung erfolgte die Umsetzung des chromogenen Farbsubstrates (BCIP/NBT) durch die Antikörper-konjugierte alkalische Phosphatase. Durch die katalytische Aktivität des Enzyms wird die Phosphatgruppe des BCIP abgespalten und gleichzeitig NBT reduziert. In dephosphorylierter Form erscheint BCIP blau, die reduzierte Form von NBT bildet einen violetten schwerlöslichen Niederschlag. Gemeinsam bilden beide Farbstoffe ein blauviolett Präzipitat. Durch Zugabe von H<sub>2</sub>O wurde die Farbreaktion gestoppt und die Membran mit einer Digitalkamera (MPEGMovieEX, Zeiss) fotografiert.

<b>Transblotpuffer:</b>	25 mM Tris Base; 192 mM Glycin; 20 % Methanol (v/v)
<b>TBST-Puffer:</b>	20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween-20
<b>TBSTM-Puffer:</b>	5 % Magermilchpulver in TBST-Puffer
<b>AP-Puffer:</b>	100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub>
<b>Färbelösung:</b>	10 ml AP-Puffer; 33 µl NBT-Lösung (50 mg/ml 70 % DMF); 33 µl BCIP-Lösung (50 mg/ml DMF)

### 2.6.3 *In vivo* Stabilitätsanalyse von SlyA

Um die Stabilität von SlyA in der stationären Phase zu untersuchen, wurde die Proteinbiosynthese einer 50 ml Übernachtskultur der Stämme DH5αZ1 wt, DH5αZ1 *lon* und DH5αZ1 *clpP*, die entweder das *slyA*<sup>+</sup> Plasmid pAW1 (*slyA*<sub>K-12</sub>) oder pAW4 (*slyA*<sub>EIEC</sub>) trugen, durch Zugabe von 200 µg/µl Chloramphenicol gestoppt. Die Kulturen wurden anschließend weiter bei 37°C inkubiert und zu den Zeitpunkten 0, 30, 60 und 90 min nach Abbruch der Proteinbiosynthese Proben entnommen. Eine exponentielle Kultur von EIEC 12860 wurde bei 25°C und 37°C inkubiert und ebenfalls zu den Zeitpunkten 0, 30, 60 und 90 min nach Abbruch der Proteinbiosynthese Proben entnommen. Die Zellen aus 1 ml Probenvolumen wurden durch Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit (Minispin Zentrifuge, Eppendorf) geerntet. Von den sedimentierten Zellen wurden wie in 2.6.1 beschrieben Ganzzellextrakte gewonnen und diese im Westernblot (siehe 2.6.2) analysiert.

### 2.6.4 Herstellung von SlyA-Antiserum

Das SlyA-Protein wurde von der Firma Davids Biotechnologie zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt und so polyklonales Antiserum gewonnen.

### 2.6.5 Reinigung des SlyA-Antiserums zur Reduzierung unspezifischer Bindungen

Um unspezifische Signale des polyklonalen SlyA-Antikörpers zu minimieren, wurde eine Reinigungsprozedur des SlyA-Antiserums durchgeführt. Dazu wurde eine 20 ml Übernachtkultur des *E. coli* Stammes MC4100 *slyA* pelletiert (SS34-Rotor in Sorvall RC5B Zentrifuge, für 10 min bei 8000 rpm) und das Pellet mit 20 ml 0,9 % NaCl gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml Transblot-Puffer (siehe 2.6.2) resuspendiert, 5 min inkubiert und abzentrifugiert (siehe vorheriger Schritt). Darauf folgte eine weitere Resuspension des Pellets in 1 ml Transblot-Puffer und eine Zentrifugation in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für 5 min bei maximaler Beschleunigung. Das Pellet wurde in 1 ml Chloroform resuspendiert und 5 min abzentrifugiert (siehe vorheriger Schritt). Die gefällten Proteine und Zellbestandteile wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit 1 ml NaCl gewaschen. Das entstandene Pellet wurde mit 200 µl des SlyA-Antiserums vorsichtig gemischt und für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend 10 min bei maximaler Beschleunigung abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

### 2.6.6 Dialyse des SlyA-Proteins

500 µl des gereinigten Proteins wurden für Protein-DNA-Bindestudien auf Dialysefiltermembranen (Millipore) in Petrischalen bei 4°C zweimal für jeweils 20 min gegen 1x DNA-Bindepuffer dialysiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

**1x DNA-Bindepuffer:** 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0; 10 mM NaCl;  
1 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM DTT; 5 % Glyzerin in H<sub>2</sub>O Millipore

### 2.6.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des *Coomassie Protein Assay Reagent Kit* (Pierce) basierend auf der Methode nach Bradford (1976) bestimmt. Als Proteinstandard diente BSA (Bovine Serum Albumin), das zur Erstellung einer Eichgerade verdünnt (0–1 mg) und in derselben Bradford-Lösung vermessen wurde.

250 µl der Bradford-Lösung wurden mit 5 µl Proteinlösung gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Im Microplate Reader (BioRad) wurde die Optische Dichte der Lösung bei 595 nm vermessen. Die Proteinkonzentration der Probe wurde anschließend anhand der BSA-Eichgerade ermittelt.

## 2.7 Elektronenmikroskopie

Die Bakterien wurden in Wachstumsmedium mit 1% Formaldehyd fixiert. Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden dünne Trägerfilme aus Kohlenstoff vorbereitet, indem Kohlenstoff auf frisch geschnittene Glimmer aufsublimiert wurde. Die Proben wurden mit 2% Uranyl-Acetat-Lösung unter Verwendung von Kupfernetzchen (300 Mesh) nach der Methode von Valentine (1968) negativ gefärbt und im Transmissionselektronenmikroskop (TEM910, Zeiss) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV bei kalibrierten Vergrößerungen untersucht. Die Bilder wurden auf Planfilm (SO-163, Kodak, USA) aufgezeichnet. Für die Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie wurden Glasdeckgläschen mit einer Poly-L-Lysin-Lösung (Sigma, München) bedeckt. 30 µl der Probe wurden zugegeben und mit 2% Glutaraldehyd in Natrium-Kalium-Phosphat Puffer fixiert. Die Dehydration wurde in einer Aceton-Verdünnungsreihe (10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100%) auf Eis für 15 min pro Schritt ausgeführt. Die Proben wurden durch Kritische-Punkt-Trocknung mit flüssigem CO<sub>2</sub> dehydriert (CPD 030, Balzers Union, Liechtenstein) und durch Goldsputtern bedeckt (SCD 040, Balzers Union, Liechtenstein). Für die Untersuchung in einem Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop (DSM 982 Gemini, Zeiss) wurde ein Inlens-SE-Detektor (Everhart Thornley SE detector) in einem 50:50 Verhältnis bei einer Beschleunigungsspannung von 5 kV benutzt.

## **2.8 Computergestützte Analysen und Bildverarbeitung**

Zur Analyse von DNA-Sequenzen wurden die Computerprogramme DNA Strider 2.0 und Lasergene DNASTar verwendet. Für den Vergleich von homologen DNA-Sequenzen wurden die Programme ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) und SeqMan (Lasergene DNASTar) angewandt. Für den Aminosäuresequenzenvergleich mehrerer Proteine wurde das Programm ClustalX (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>) verwendet. Westernblot-Membranen wurden mit einer Digitalkamera (MPEGMovieEX, Zeiss) fotografiert. Röntgenfilme wurden eingescannt. Bilder aus DNA-Gelretardationsanalysen wurden in der Gel-Dokumentationsanlage digital fotografiert und mit der Software „QuantityOne“ sowie mit den Bildbearbeitungsprogrammen Adobe Photoshop 5.0/7.0 und Macromedia FreeHand 8/MX bearbeitet. Diagramme wurden mit Microsoft Excel 2001/2003 erstellt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Synthese des globalen Regulators SlyA in pathogenen und apathogenen Virotypen von *Escherichia coli*

##### 3.1.1 Die Menge des SlyA-Proteins unterscheidet sich in *E. coli* K-12 MC4100, EPEC JPN15, EIEC 12680 und EHEC EDL933

RovA (regulator of virulence A), ein Mitglied der MarR/SlyA Familie von globalen Transkriptionsfaktoren, reguliert die Expression des *invasin* (*inv*) Gens aus *Yersinia spp.*, dem primären Adhäsions- und Invasions-Faktor in *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis*. Vorangehende Studien zeigten, dass *inv* in pathogenen *E. coli* Stämmen durch das RovA-Homolog SlyA induziert wird, während in dem apathogenen Stamm *E. coli* K-12 keine solche Induktion stattfindet (A.-K. Wagner, Diplomarbeit). Eine genauere Untersuchung ergab, dass die *inv*-Expression in *E. coli* K-12 bei Plasmid-vermittelter Expression des *slyA*<sub>K-12</sub>-Gens unter Kontrolle des pBAD-Promotors in ähnlichem Maße induziert werden kann wie durch SlyA der pathogenen Stämme. Somit ist das Genprodukt des *slyA*-Gens in *E. coli* K-12 in dieser Hinsicht voll funktionsfähig, und Unterschiede scheinen durch eine unterschiedliche Synthese von SlyA hervorgerufen zu werden.

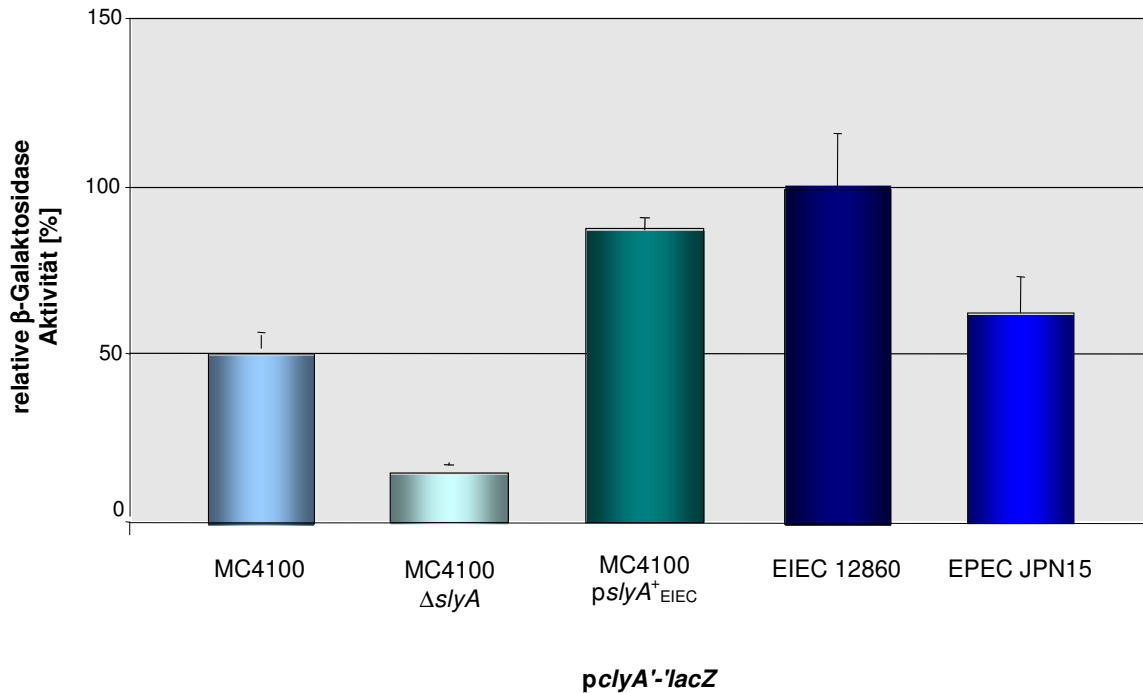
Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob auch ein als SlyA-reguliert bekanntes Gen in *E. coli* K-12 anders als in pathogenen *E. coli* Stämmen reguliert wird. Dazu wurde die Expression des porenformenden Hämolyisins *clyA* (*hlyE*, *sheA*) in *E. coli* K-12 MC4100, EIEC 12860 und EPEC JPN15 Stämmen untersucht. ClyA stellt den Prototyp einer neuen Toxin-Familie dar, die bei den *Enterobacteriaceae* entdeckt wurde (von Rhein *et al.*, 2009). Bei ClyA handelt es sich um ein 34-kDa großes, exportiertes Protein, das durch die Bildung von 400 kDa großen Dodecameren stabile Transmembranporen formt (del Castillo *et al.*, 1997; Eifler *et al.*, 2006; Tzokov *et al.*, 2006, Mueller *et al.*, 2009). Funktionelle Kopien dieses Gens wurden in verschiedenen intestinal-pathogenen *E. coli* (IPEC) Stämmen gefunden, dazu gehören Shiga-Toxin-Produzenten, enteroinvasive, enteroaggregative und enterotoxigene Stämme, außerdem in avian-pathogenen Stämmen und im apathogenen *E. coli* Stamm K-12 (Oscarsson *et al.*, 1996; del Castillo *et al.*, 2000; Ludwig *et al.*, 2004, Wyborn *et al.*, 2004a). Funktionelles ClyA wurde außerdem in den *Salmonella* Serovaren Typhi und Paratyphi A nachgewiesen (McClelland *et al.*, 2004), in vielen anderen Serovaren fehlt es dagegen (McClelland *et al.*, 2001; von Rhein *et al.*, 2009) und in *Shigella* wurden bisher nur nicht-funktionelle *clyA*-Genkopien gefunden (von Rhein *et al.*, 2008). PCR- und Southernblot-Untersuchungen zeigten, dass *clyA*-ähnliche Sequenzen in vielen anderen Enterobacteriaceen fehlen (von Rhein *et al.*, 2008). Unter Standard in vitro

Wachstumsbedingungen ist der *clyA*-Lokus in *E. coli* K-12 kryptisch, da die *clyA*-Transkription durch den globalen Regulator H-NS (histone-like nucleoid structuring protein) reprimiert wird (Westermarck *et al.*, 2000). Die *clyA*-Expression kann jedoch als Antwort auf Glukose-Mangel durch CRP sowie als Antwort auf Sauerstoff-Mangel durch FNR induziert werden (Green & Baldwin 1997a;b; Ralph *et al.*, 1998, Westermarck *et al.*, 2000; Wyborn *et al.*, 2004b). Auch die Überexpression von SlyA induziert *clyA* in *E. coli* (Ludwig *et al.*, 1995; 1999), da es die H-NS Bindung am *clyA*-Promotor inhibiert (Wyborn *et al.*, 2004b, Lithgow *et al.*, 2007). Auch in *S. Paratyphi A* wird die *clyA*-Transkription durch SlyA positiv reguliert (von Rhein *et al.*, 2009).

Die Aktivierung der ClyA-Synthese durch SlyA wurde anhand einer vergleichenden Expressionsanalyse nachgewiesen (siehe Abb. 3.1). Dazu wurde die Expression einer Plasmid-kodierten *clyA*'-'*lacZ*-Fusion in einem *E. coli* K-12 Wildtyp-Stamm mit der in der korrespondierenden *slyA*-Mutante verglichen und einem *slyA*-überexprimierenden Derivat gegenübergestellt, das die *slyA*-Sequenz von EIEC 12860 unter Kontrolle des pBAD Promotors trug. Die Mutation von *slyA* führte zu einer dreifachen Reduktion der *clyA*-Expression gegenüber dem Wildtyp, die *slyA*-Überexpression zu einer 1,7fachen Induktion. Diese Ergebnisse belegen die positive Regulation der ClyA-Synthese durch SlyA.

Um weiterhin zu verifizieren, dass die hämolytische Aktivität in den pathogenen Stämmen von SlyA abhängig war, wurden ein *slyA*-defizienter Stamm von EIEC 12860 sowie ein MC4100 Derivat untersucht, das ein Plasmid mit der *slyA*-Sequenz von EIEC 12860 unter Kontrolle des pBAD Promotors trug (siehe Abb. 3.2). Die EIEC *slyA*-Mutante zeigte signifikant geringere hämolytische Eigenschaften als der Wildtyp, während die Hämolyse in MC4100 durch die plasmidkodierte *slyA* Sequenz stark induziert wurde.

Zum detaillierten Vergleich der *clyA*-Expression in verschiedenen *E. coli* Stämmen wurde ein  $\beta$ -Galaktosidase-Assay durchgeführt, in dem die Expression einer auf dem Plasmid pAW66 kodierten *clyA*'-'*lacZ*-Fusion in *E. coli* K-12 MC4100, EIEC 12860 und EPEC JPN15 verglichen wurde (siehe Abb. 3.1). Die *clyA*'-'*lacZ* Fusion wurde in EIEC 2,3fach und in EPEC 1,3fach höher als in *E. coli* K-12 MC4100 exprimiert. Die vermehrte Hämolysinbildung zeigte sich auch in der Bildung größerer Hämolysehöfe auf Enterohämolysin-Blutagar Platten durch die pathogenen Stämme EIEC 12860 und EHEC EDL933 (Abb. 3.2). Bei EPEC JPN15 waren die Höfe etwas weniger ausgeprägt und *E. coli* K-12 MC4100 zeigte keine hämolytische Aktivität.



**Abb. 3.1:** Induktion der *cl<sub>y</sub>A*'-lacZ-Expression in *E. coli* K-12 MC4100, *E. coli* K-12 $\Delta slyA$ , *E. coli* K-12  $pSlyA^+$ , EIEC 12860 und EPEC JPN15

Die Promotorsequenz des *cl<sub>y</sub>A*-Gens wurde an das promotorlose *lacZ*-Gen im Vektor pGP20 kloniert und das resultierende Plasmid pAW66 in die Stämme *E. coli* K-12 MC4100 sowie den korrespondierenden *slyA*-defizienten und *slyA*-überexprimierenden Stamm, in EIEC 12860 und EPEC JPN15 eingebracht. Die Transformanten wurden bei 37°C in LB-Medium über Nacht angezogen und ein β-Galaktosidase-Aktivitäts-Assay durchgeführt. Die spezifische β-Galaktosidase-Aktivität wurde als Dreifachbestimmung gemessen.

<i>E. coli</i> K-12 MC4100	<i>E. coli</i> K-12 MC4100 $pSlyA^+$	EIEC 12860	EIEC 12860 $\Delta slyA$	EHEC EDL933	EPEC JPN15

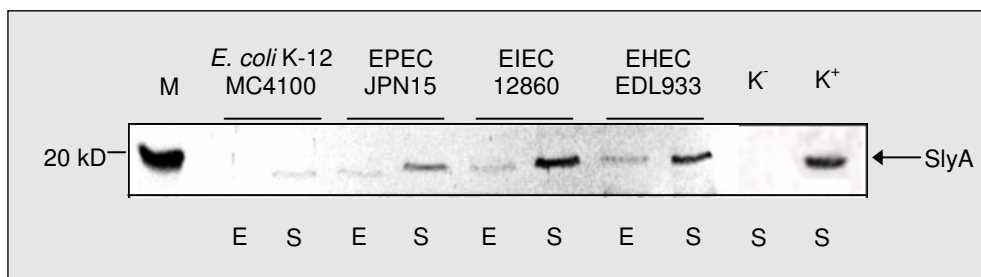
**Abb. 3.2:** Phänotypischer Nachweis der Unterschiede in der SlyA-abhängigen ClyA-Synthese verschiedener *E. coli* Stämme

Enterohämolysin-Blutagar-Fertigplatten (Oxoid) wurden mit Einzelkolonien der Stämme *E. coli* K-12 MC4100 wt sowie eines *slyA*-überexprimierenden Derivats dieses Stammes, EIEC 12860 wt und einer EIEC 12860 *slyA*-Mutante, EHEC EDL933 und EPEC JPN15 inokuliert und für 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Hämolysebildung wurde durch Digitalfotographie dokumentiert.

Die Ursache für die fehlende Induktion der *cl<sub>y</sub>A*- bzw. *inv*- Expression in *E. coli* K-12 könnte auf eine geringere Menge des SlyA-Proteins in diesem Stamm verglichen mit den pathogenen *E. coli* Varianten zurückzuführen sein. Dieser Unterschied sollte auf



Proteinebene nachgewiesen werden. Dazu wurde das SlyA-Protein in Ganzzelextrakten der Stämme *E. coli* K-12 MC4100, EIEC 12680, EPEC JPN15 und EHEC EDL933 immunologisch mit Hilfe eines Westernblots als 16 kDa großes Dimer nachgewiesen (siehe Abb.3.3). Die Ganzzelextrakte wurden aus exponentiell und stationär kultivierten Stämmen generiert. Als Negativ-Kontrolle diente ein *slyA*-defizienter, als Positiv-Kontrolle ein *slyA*-überexprimierender *E. coli* K-12 Stamm. In allen Stämmen wurde generell eine größere SlyA-Menge in der stationären Wachstumsphase detektiert. In *E. coli* K-12 MC4100 waren jedoch auch in den stationären Zellen nur geringe Mengen des SlyA-Proteins nachweisbar, in den exponentiellen Zellen lag die Proteinmenge sogar unterhalb der Nachweisgrenze. Die höchsten intrazellulären SlyA-Spiegel wurde in EIEC 12680 und EHEC EDL933 beobachtet, während die SlyA-Menge in EPEC JPN15 intermediär zwischen dem apathogenen *E. coli* K-12 MC4100 und den anderen pathogenen Stämmen lag. Dieses Ergebnis korrespondiert mit der *clyA*-Syntheserate der Stämme.



**Abb. 3.3:** Immunologischer Nachweis differentieller SlyA-Mengen in apathogenen und pathogenen *E. coli* Stämmen

*E. coli* K-12 MC4100, EPEC JPN15, EIEC 12680 und EHEC EDL933 wurden in LB Medium bei 37°C kultiviert und in der exponentiellen (E) und stationären (S) Phase geerntet. Von gleichen Zellzahlen ausgehend wurden Ganzzelextrakte gewonnen, die Proteine in einem 15 % Gel mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon-Membran transferiert. Das SlyA Protein (Pfeil) wurde durch einen polyklonalen SlyA-Antikörper visualisiert. Größe und Position der Standard-Proteine sind in der linken Spur angezeigt (M). Ein *slyA*-defizienter *E. coli* K-12 Stamm wurde als Negativkontrolle aufgetragen (K<sup>-</sup>), als Positivkontrolle diente ein *E. coli* K-12 Stamm, der ein Plasmid-kodiertes *slyA*-Gen trägt (K<sup>+</sup>).

## 3.1.2 *in vivo* Analyse der SlyA Stabilität in EIEC 12680, *E. coli* K-12 DH5αZ1, DH5αZ1 *lon* und DH5αZ1 *clpP*

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Stabilität des SlyA-Proteins als regulatorischer Faktor wirkt und in den verschiedenen *E. coli* Stämmen variiert. Einen Hinweis auf solch einen Mechanismus liefert das SlyA-homologe Protein RovA in *Yersinia*, ein Temperatur-wahrnehmendes Protein, bei dem sich durch einen temperaturinduzierten Konformationswechsel die DNA-Bindfähigkeit ändert und das Protein empfänglich für

regulierte Proteolyse wird. Das RovA-Protein ist während der stationären Phase und bei 25°C stabil, wird aber bei exponentiellem Wachstum bei 37°C hochgradig instabil (Herbst *et al.*, 2009). Sein Abbau unter diesen Bedingungen erfolgt vor allem durch die Lon-Protease, einen kleinen Teil zum Abbauprozess trägt jedoch auch die Clp-Protease bei (Herbst *et al.*, 2009). Interessanterweise ist RovA weniger empfänglich für die Proteasen, wenn es an DNA gebunden vorliegt, da offenbar Aminosäuren innerhalb der DNA-bindenden Region die für die Proteolyse erforderliche Information enthalten (Herbst *et al.*, 2009). Beide Proteasen gehören zur AAA<sup>+</sup> Superfamilie der ATPasen. Sie beseitigen gewöhnlich denaturierte, fehlgefaltete oder beschädigte Proteine oder verhindern deren Aggregation, da diese schwerwiegende Folgen für die zelluläre Funktion haben könnten. Doch auch unbeschädigte Proteine können als Substrate dienen, insbesondere katalysieren sie den Abbau kurzlebiger regulatorischer Faktoren, die in Entwicklungsprozesse, Stressresistenz und die bakterielle Fitness involviert sind und wirken somit selbst regulatorisch (Licht & Lee, 2008; Gottesman, 2003; Sauer *et al.*, 2004).

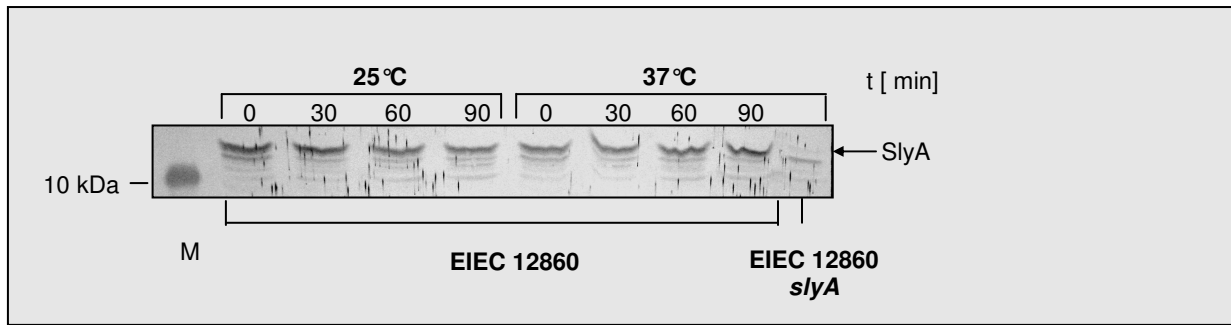
Um zu untersuchen, ob auch das zu RovA homologe SlyA-Protein einer proteolytischen Regulation unterworfen ist, wurde die Stabilität des SlyA-Proteins in EIEC 12860 in der exponentiellen Phase bei zwei Wachstumstemperaturen (25°C und 37°C) verglichen. Die Proteinbiosynthese wurde durch Zugabe von Chloramphenicol blockiert und 0 min, 30 min, 60 min und 90 min nach Abbruch der Proteinbiosynthese Proben entnommen. Die verbliebene SlyA-Menge wurde durch eine Westernblot-Analyse detektiert.

Aus Abbildung 3.4 A geht hervor, dass bei beiden Temperaturen gleiche Mengen des SlyA Proteins in EIEC 12860 vorliegen und kein bzw. lediglich ein leichter Abbau bei 25°C zu verzeichnen ist.

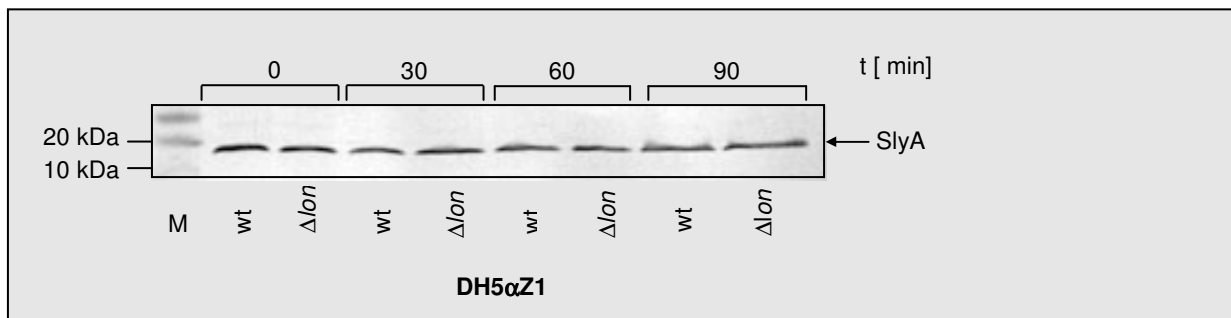
Eine Ursache der heterologen SlyA-Mengen in *E. coli* K-12 und den pathogenen Stämmen könnte demnach in einer höheren Abbaurate durch die Lon- und/oder Clp-Protease in *E. coli* K-12 liegen. Im weiteren Vorgehen wurden stationäre Kulturen von DH5 $\alpha$ Z1 wt, DH5 $\alpha$ Z1 *lon* und DH5 $\alpha$ Z1 *clpP* bei 37°C inkubiert und nach 0 min, 30 min, 60 min und 90 min nach Abbruch der Proteinbiosynthese Proben entnommen. Beide Stämme trugen das *slyA*<sup>+</sup> Plasmid pAW1 (*slyA*<sub>K-12</sub>), um den SlyA-Spiegel auf ein detektierbares Maß zu erhöhen. Die SlyA-Menge wurde durch eine Westernblot-Analyse detektiert.

In *E. coli* K-12 DH5 $\alpha$ Z1 war kein deutlicher Abbau des SlyA-Proteins gegenüber den Mutanten zu verzeichnen und nach 90 min konnten vergleichbare SlyA-Mengen detektiert werden wie zum Zeitpunkt 0 des Experimentes (siehe Abb. 3.4 B1 und B2). Somit wird SlyA unter den getesteten Bedingungen weder durch die ClpP- noch durch die Lon-Protease verstärkt abgebaut.

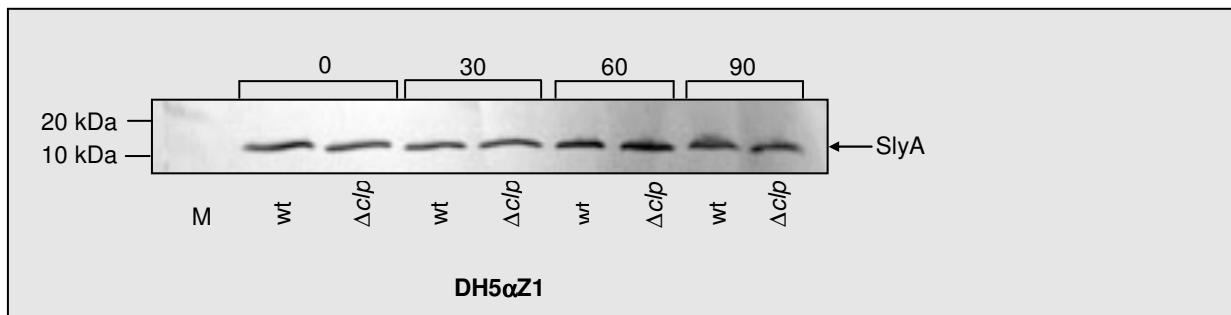
**A**



**B.1**



**B. 2**



**Abb. 3.4:** Stabilitäts-Analyse von Wildtyp SlyA-Protein in DH5αZ1 abhängig von den Proteasen Lon und ClpP und in EIEC 12860 abhängig von der Temperatur

A: Exponentielle Kulturen von EIEC 12860 wt wurden bei 25°C und 37°C angezogen und die Proteinbiosynthese durch Zugabe von Chloramphenicol in einer Endkonzentration von 200 µg/ml gestoppt. In der rechten Spur wurde ein *slyA*-defizientes Derivat von EIEC 12860 als Negativkontrolle aufgetragen.

B: Übernachtskulturen von DH5αZ1 wt sowie *lon*<sup>-</sup> (Abb. B.1) und *clpP*<sup>-</sup> (Abb. B.2) defizienten Derivaten, die auf Plasmid pAW1 kodiertes *slyA* aus *E. coli* K-12 CC118λpir exprimierten, wurden bei 37°C angezogen und die Proteinbiosynthese durch Zugabe von 200 µg/ml Chloramphenicol gestoppt. Zu den ausgewiesenen Zeitpunkten (t) wurden Proben entnommen und von gleichen Zellzahlen ausgehend Ganzzellextrakte gewonnen. Die Proteine wurden in einem 15 % Gel mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon-Membran transferiert. Das SlyA-Protein (Pfeil) wurde durch einen polyklonalen SlyA-Antikörper visualisiert. Größe und Position der Standard-Proteine sind in der linken Spur angezeigt (M).

In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die kodierenden Regionen des *slyA*-Gens von *E. coli* K-12 CC118 $\lambda$ pir und MC41000, EIEC 12860 und EPEC JPN15 lediglich in einigen Nukleotiden voneinander abweichen, was nicht zu Aminosäure-Austauschen des SlyA-Proteins führt (siehe Abb. 4.1).

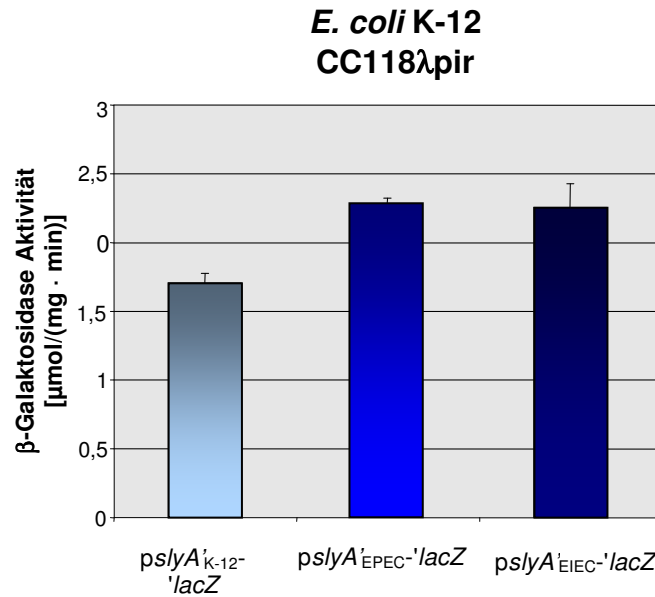
Der Unterschied im SlyA-Level konnte somit in einer geringeren Expressions- oder Syntheserate in *E. coli* K-12 begründet sein.

### 3.1.3 *slyA*-Expressions-Analyse in *E. coli* K-12 CC118 $\lambda$ pir, EIEC 12860 und EPEC JPN15

Um zu untersuchen, ob die höhere SlyA-Menge in den pathogenen Stämmen auf eine stärkere Induktion der *slyA*-Expression zurückzuführen sei, wurde der regulatorische Bereich des jeweiligen *slyA*-Gens aus den Stämmen *E. coli* K-12 CC118 $\lambda$ pir, EPEC JPN15 und EIEC 12860 vor das Promotor-lose *lacZ*-Gen des "high-copy" Vektors pJL28 kloniert. Die Expression der resultierenden Plasmide pAW13, pAW15 und pAW16 wurde im apathogenen Stamm *E. coli* K-12 CC118 $\lambda$ pir vermessen. Abb. 3.5 ist zu entnehmen, dass die *slyA*-Fusionen aus den pathogenen Stämmen in *E. coli* K-12 tatsächlich etwa 1,4fach stärker exprimiert wurden als die Fusion aus *E. coli* K-12.

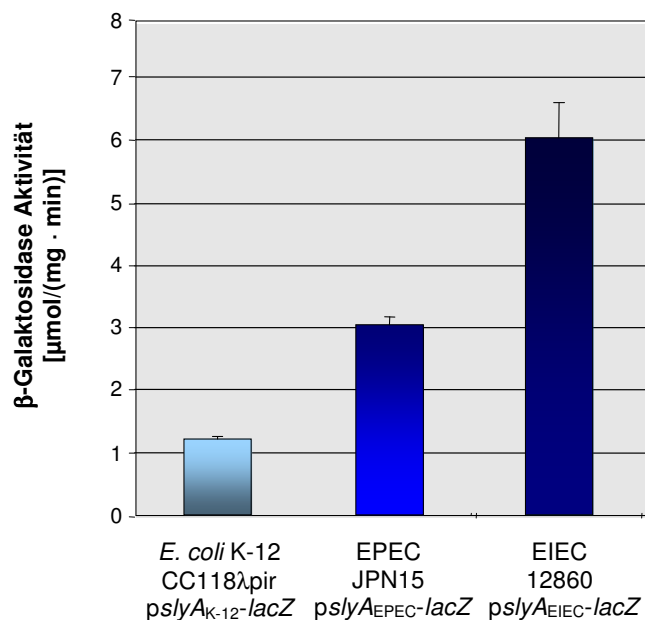
Um diesen Unterschied in den verschiedenen Stämmen besser analysieren zu können, wurden die *slyA*'-'*lacZ*-Fusionen aus *E. coli* K-12, EPEC und EIEC in den „low-copy“ Vektor pHSG575 umklont und in den jeweilig zugehörigen Stamm eingebracht (Abb. 3.6). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Westernblot-Analyse wurde die höchste Expressionsrate in EIEC 12860 beobachtet, die 5fach stärker als die in *E. coli* K-12 war. In EPEC JPN15 war die Expressionsrate doppelt so hoch wie in *E. coli* K-12.

Die Ergebnisse von Abb. 3.5 und 3.6 verdeutlichen, dass zwei Effekte sich auf die *slyA*-Regulation auswirken: zum einem wird die *slyA*'-'*lacZ*-Fusion des *E. coli* K-12 Stammes nicht so stark exprimiert wie die der pathogenen Stämme, zum anderen ist die Expression der Fusionen (inklusive der aus dem apathogenen Stamm) in einem pathogenen Stammhintergrund generell deutlich höher als in *E. coli* K-12. Somit scheinen sowohl cis- als auch trans-regulatorische Faktoren für die unterschiedlichen SlyA-Level in den pathogenen und apathogenen Stämmen verantwortlich zu sein.



**Abb. 3.5:** Untersuchung der Expression des *slyA*-Promotors aus *E. coli* K-12 CC118λpir, EIEC 12860 und EPEC JPN15 in *E. coli* K-12

Die Plasmide pAW13, (*slyA'*<sub>K-12</sub>-*'lacZ*) pAW15 (*slyA'*<sub>EPEC</sub>-*'lacZ*) und pAW16 (*slyA'*<sub>EIEC</sub>-*'lacZ*) wurden in *E. coli* K-12 CC118λpir eingebracht. Von den so generierten Stämmen wurden Übernachtskulturen bei 37°C in LB-Medium angezogen und ein β-Galaktosidase-Aktivitäts-Test durchgeführt. Die Enzym-Aktivität wurde in Doppelbestimmungen in drei unabhängigen Experimenten gemessen und ist in μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> angegeben.



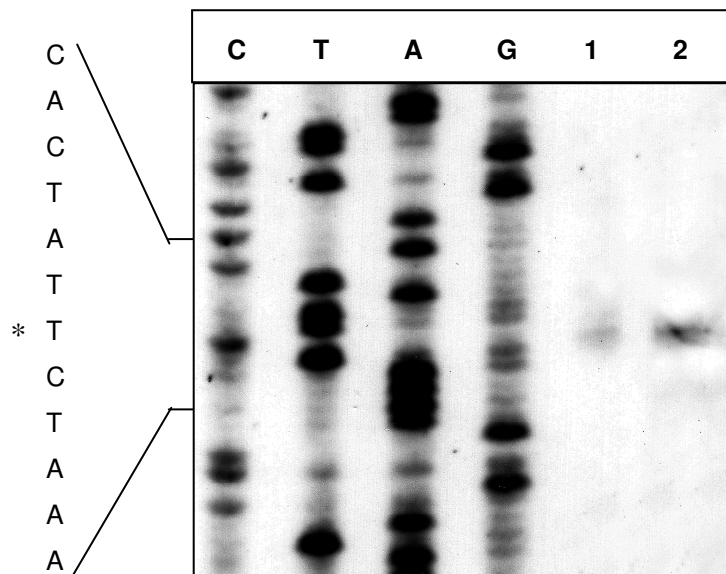
**Abb. 3.6:** Expression von *slyA* in Abhängigkeit des Stammhintergrundes

Die Plasmide, die die *lacZ*-Genfusion mit dem *slyA*-Promotor aus *E. coli* K-12 CC118λpir, EPEC bzw. EIEC kodieren, wurden jeweils in denjenigen Stamm transformiert, aus dem die *slyA*-Promotorsequenz amplifiziert worden war. Die Transformanten wurden über Nacht bei 37°C angezogen und die Expression der *slyA'*-*'lacZ* Fusionen in einem β-Galaktosidase-Aktivitäts-Test bestimmt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden, und sind in μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> angegeben.

### 3.2 Relative Quantifizierung der SlyA-Transkripte aus *E. coli* K-12 MC4100 und EIEC 12860 und Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte mittels Primer-Extension-Analyse

Um die Promotorelemente des *slyA*-Lokus zu identifizieren, wurden die Transkriptionsstartpunkte der *slyA*-Gene von *E. coli* K-12 MC4100 und EIEC 12680 durch eine Primer-Extension-Analyse bestimmt und die relativen Transkriptmengen beider Gene quantifiziert.

In beiden regulatorischen *slyA*-Regionen wurde ein dominanter Transkriptions-Initiationspunkt 48 Nukleotide stromaufwärts des Startcodons TTG bei einer Thymin-Base lokalisiert (Abb.3.7). Somit benutzen vermutlich beide Stämme denselben Promotor, wobei die Menge des *slyA*-Transkripts in EIEC 12860 wesentlich höher ist als in *E. coli* K-12 MC4100. Dieser Befund stützt die Hypothese, dass die in den pathogenen *E. coli* Stämmen vorliegende höhere SlyA-Menge durch eine stärkere Aktivität des *slyA*-Promotors verursacht wird.



**Abb. 3.7:** Primer-Extension-Analyse des *slyA*-Gens aus *E. coli* K-12 MC4100 (1) bzw. EIEC 12860 (2)

20 µg Gesamt-RNA der Stämme *E. coli* K-12 MC4100 (1) und EIEC 12860 (2) wurde für die Detektion der Transkriptionsstartpunkte verwendet und zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes mit dem DIG-markierten Oligonukleotid I273 inkubiert. Der Transkriptionsstartpunkt 48 bp stromaufwärts des *slyA*-Translationsstarts ist mit einem Stern gekennzeichnet. Die Sequenzleiter ist in den vier linken Spuren gezeigt.



Die Expression der auf den Plasmiden *pslyA*<sub>K-12</sub><sup>-'</sup>/*lacZ*, *pslyA*<sub>EPEC</sub><sup>-'</sup>/*lacZ* und *pslyA*<sub>EIEC</sub><sup>-'</sup>/*lacZ* kodierten *slyA*-Reportergenfusionen wurde im Donor-Wildtyp-Stamm und der isogenen *slyA*-Mutante verglichen. Die Stämme wurden über Nacht bei 37°C angezogen und die Enzym-Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase bestimmt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, die jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt wurden, und sind in  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  angegeben.

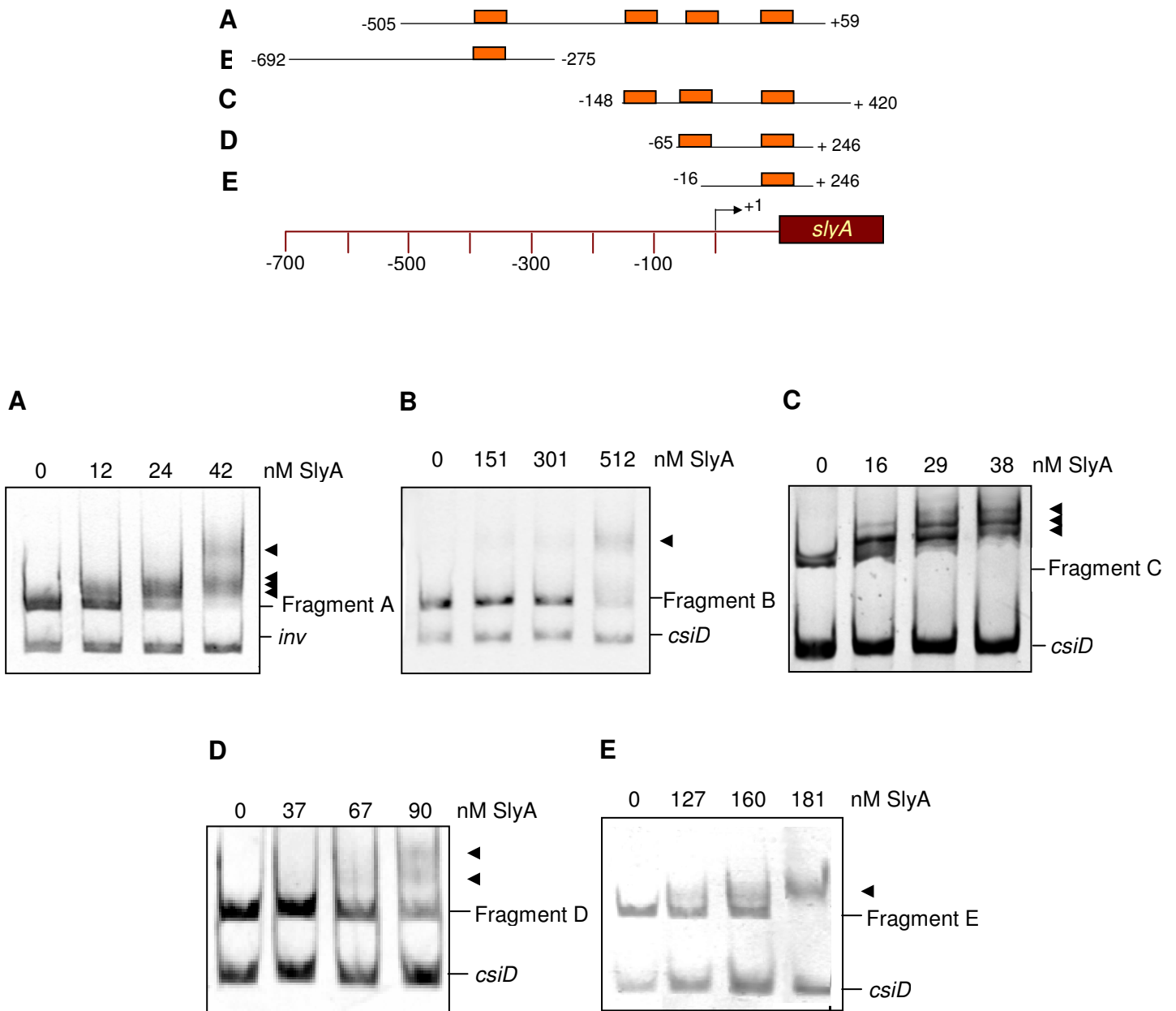
### 3.4 Charakterisierung regulatorischer Elemente von *slyA* durch DNA/Protein Interaktionsstudien

#### 3.4.1 Detektion von SlyA-Bindestellen in der *slyA*-Promotorregion durch Gelretardationsexperimente

Um den Mechanismus der SlyA-Autoregulation näher zu untersuchen, wurden DNA-Bindestudien durchgeführt. Zunächst sollte mit Hilfe von Gelretardationsexperimenten die direkte Bindung von SlyA an die regulatorische Region des *slyA*-Gens nachgewiesen werden. Für die DNA-Bindestudien wurden etwa 250 bis 600 bp lange DNA-Fragmente eingesetzt. Die verwendeten Primer sind der Tab. 2.11 zu entnehmen, die Primer-Sequenzen der Tab. 2.10. Um die Spezifität der SlyA-Bindung an das jeweilige Fragment zu untersuchen, wurde dem Reaktionsansatz zusätzlich ein DNA-Fragment mit niedriger Affinität für SlyA als Kompetitor zugesetzt. Beide DNA-Fragmente wurden simultan mit ansteigenden Konzentrationen von gereinigtem SlyA-Protein aus *E. coli* K-12 inkubiert und entstandene Protein-DNA-Komplexe anschließend in einem 4%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Das SlyA-Protein interagiert direkt und spezifisch mit Sequenzen stromaufwärts der kodierenden *slyA*-Region (Abb. 3.10). Die Detektion von mehreren Shifts indiziert dabei das Vorhandensein von mehreren SlyA-Bindestellen innerhalb der untersuchten Region. Die Interaktion von SlyA-Protein mit der Promotorsequenz A, die den gesamten untersuchten Bereich abdeckt, führte zur Bildung von vier distinkten hochmolekularen SlyA-DNA-Komplexen (Abb. 3.10 A). Um die potentiellen SlyA-Bindestellen weiter eingrenzen zu können, wurden kleinere Teilfragmente (B-E) von Fragment A synthetisiert und SlyA-Bindestudien durchgeführt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich eine SlyA-Bindestelle weit stromaufwärts im Bereich zwischen -505 und -275 relativ zum Transkriptionsstart befindet (Abb. 3.10 B). Eine zweite liegt im Bereich zwischen -148 und -65 (Abb. 3.10 C), eine weitere zwischen -65 und -16 (Abb. 3.10 D). Die vierte Bindestelle wurde im Bereich -16 bis +246 lokalisiert, so dass sie mit dem Transkriptionsstart überlappt (Abb. 3.10 E)





**Abb. 3.10:** Gelretardation des *slyA*-Promotors durch Bindung von SlyA

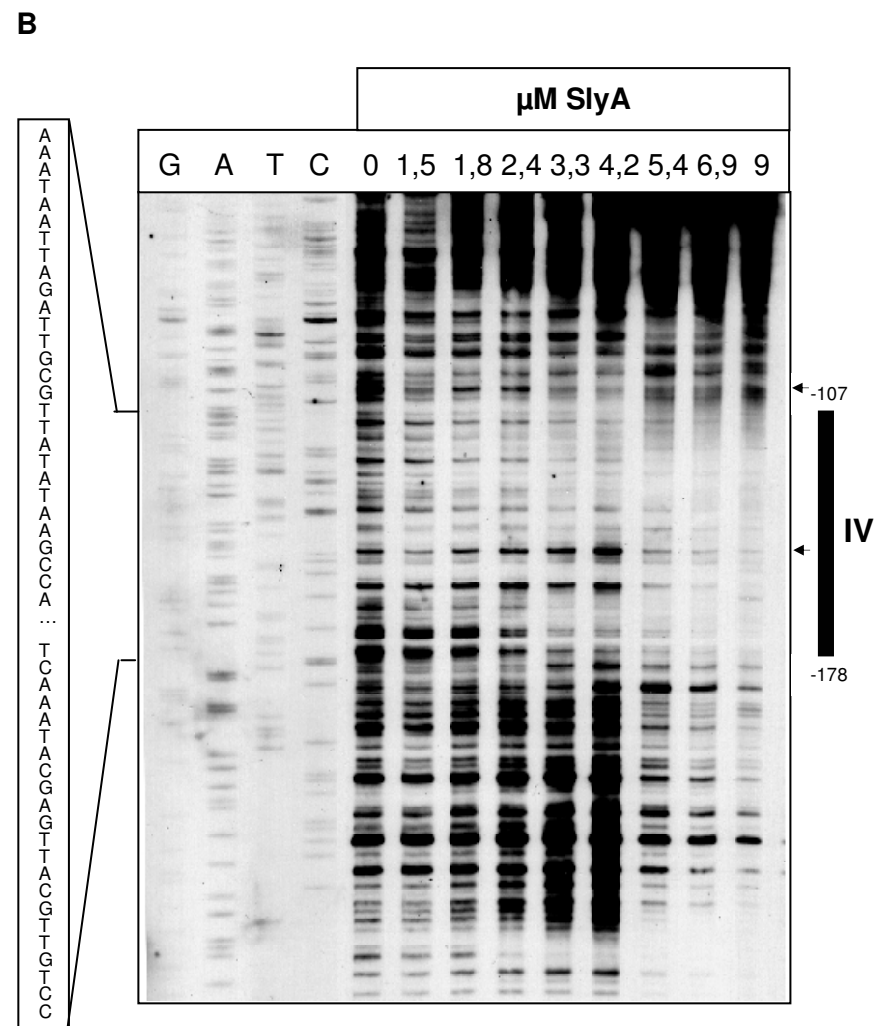
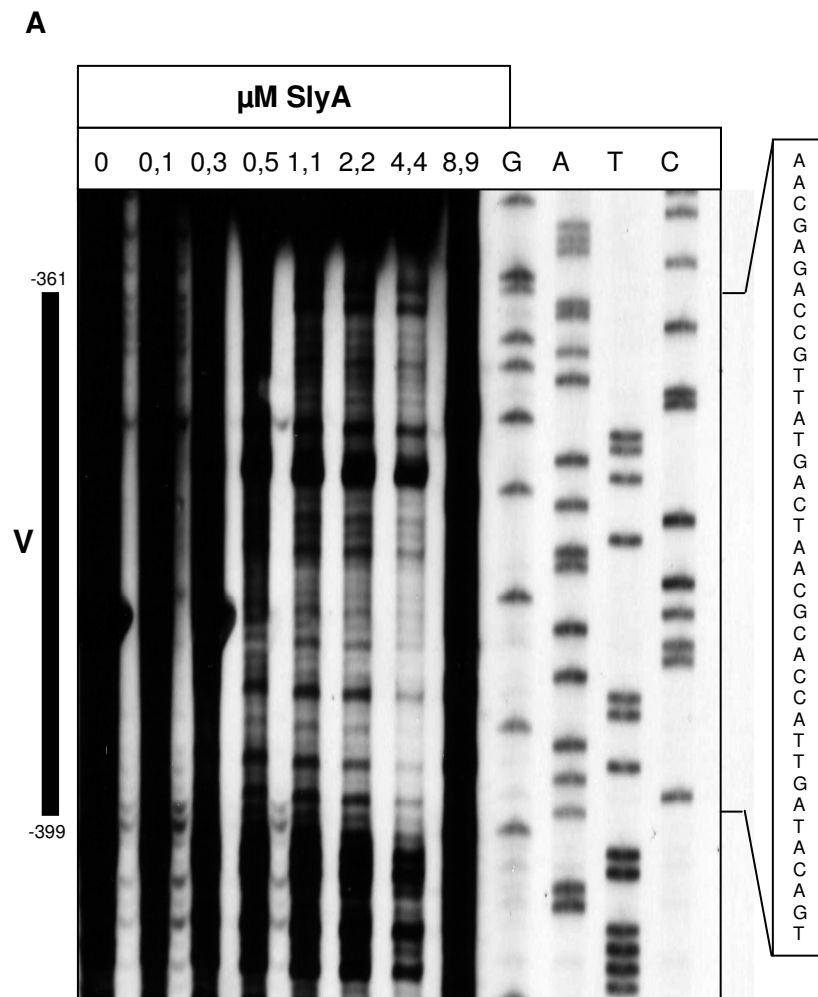
Die Bindung von gereinigtem SlyA-Protein an PCR-generierte *slyA*-Promotorfragmente von ca. 250 bis 600 bp Größe wurde *in vitro* anhand von Gelretardations-Analysen untersucht. Als Kompetitor wurden je nach Größe des untersuchten *slyA*-Fragments unterschiedliche Promotor-Fragmente des *csiD*- und *inv*-Gens eingesetzt. Ziel- und Kontrollfragment wurden in einem Reaktionsansatz mit aufsteigenden Mengen oder ohne SlyA-Protein inkubiert. Die Auftrennung der SlyA-DNA-Komplexe erfolgte über 4 %ige PAGE. Pfeilspitzen markieren die retardierten SlyA-DNA-Komplexe. Im oberen Teil sind die verwendeten Fragmente und die SlyA-regulierte Region schematisch dargestellt. Die Zahlen sind relativ zum Transkriptionsstart angegeben. Die Lokalisation der detektierten SlyA-Bindestelle wird durch einen orange-farbenen Balken markiert.

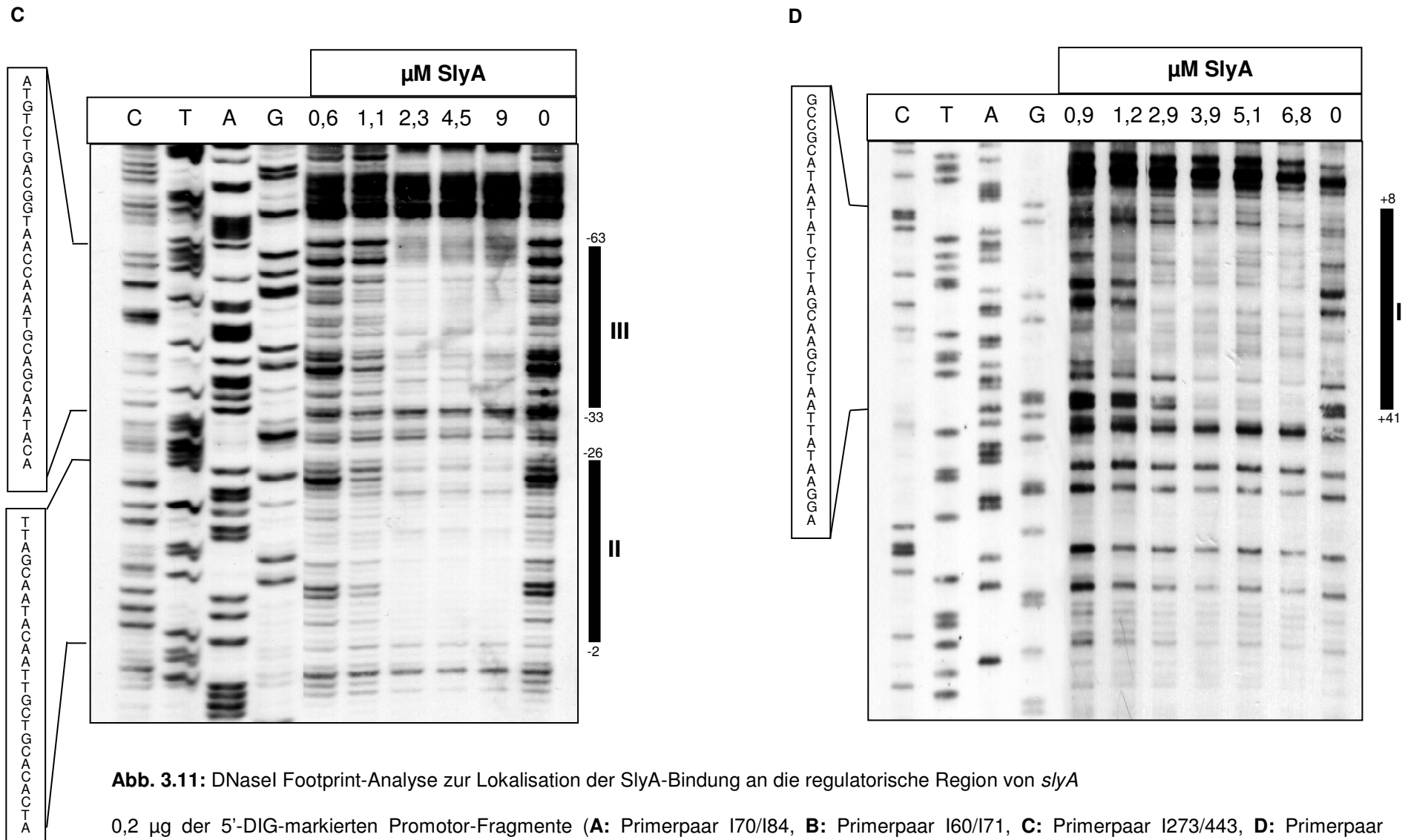
### 3.4.2 Basengenaue Identifikation der SlyA-Bindestellen durch DNaseI Protektionsversuche

Durch Gelretardations-Experimente konnten vier SlyA-Bindestellen in der *slyA*-Promotorregion nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.10). Zur genauen Lokalisation dieser Bindestellen wurden DNaseI Footprint-Analysen mit SlyA-Protein und verschiedenen DNA-Fragmenten des *slyA*-Promotorbereichs durchgeführt.

Dazu wurde gereinigtes SlyA-Protein aus *E. coli* K-12 in aufsteigender Konzentration mit DIG-markierten DNA-Sonden der *slyA*<sub>K-12</sub>-Promotorregionen inkubiert. Zu ihrer Amplifikation wurden die Primer I70/I84 (Abb. 3.11 A), I60/I71 (Abb. 3.11 B), I273/443 (Abb. 3.11 C) und I347/443 (Abb. 3.11 D) verwendet. Der geschützte Bereich konnte anhand der Sequenzierungsreaktion identifiziert werden, die mit demselben DIG-markierten Primer wie das entsprechende Fragment generiert und mit aufgetrennt wurde.

Es wurden fünf durch das SlyA-Protein vor dem DNase-Abbau geschützte Bereiche detektiert. Eine Bindestelle befindet sich relativ weit stromaufwärts des Transkriptionsstarts, zwischen Position -361 und -399 (im Folgenden als Bindestelle V bezeichnet), eine weitere dehnt sich von Position -178 bis zu Position -107 aus (Bindestelle IV). Eng benachbart erstrecken sich zwei Bindestellen von Position -63 bis zu -33 (Bindestelle III) sowie von Position -26 bis zu -2 (Bindestelle II). Diese Bindestellen überlappen mit der postulierten -35 und -10 Region. Sie konnten vermutlich im Gelretardationsexperiment nicht als zwei getrennte Bindestellen differenziert werden, woraus sich die im DNaseI Protektions-Assay zusätzlich identifizierte Bindestelle erklären lässt. Die fünfte Bindestelle ist stromabwärts des Startpunktes im Bereich von +8 bis +41 lokalisiert (Bindestelle I). Der vor dem DNaseI-Verdau geschützte Bereich wird in allen Experimenten mit Abnahme der SlyA-Konzentration gleichmäßig freigegeben, wobei auffällt, dass ein erster Abbau-Schutz der DNA an Bindestelle II und V bereits bei einer SlyA-Konzentration von 1,1 µM eintritt, während die stromaufwärts gelegene Bindestelle I erst bei 2,9 µM geschützt wird. Demnach ist die Affinität von SlyA für die Bindestellen II und V am höchsten, gefolgt von Bindestelle IV, Bindestelle III und schließlich Bindestelle I. Innerhalb der Bindestelle IV liegen zwei SlyA-induzierte hypersensitive Bereiche. Dies deutet darauf hin, dass durch die Bindung von SlyA die DNA-Topologie verändert wird.





**Abb. 3.11:** DNaseI Footprint-Analyse zur Lokalisation der SlyA-Bindung an die regulatorische Region von *slyA*

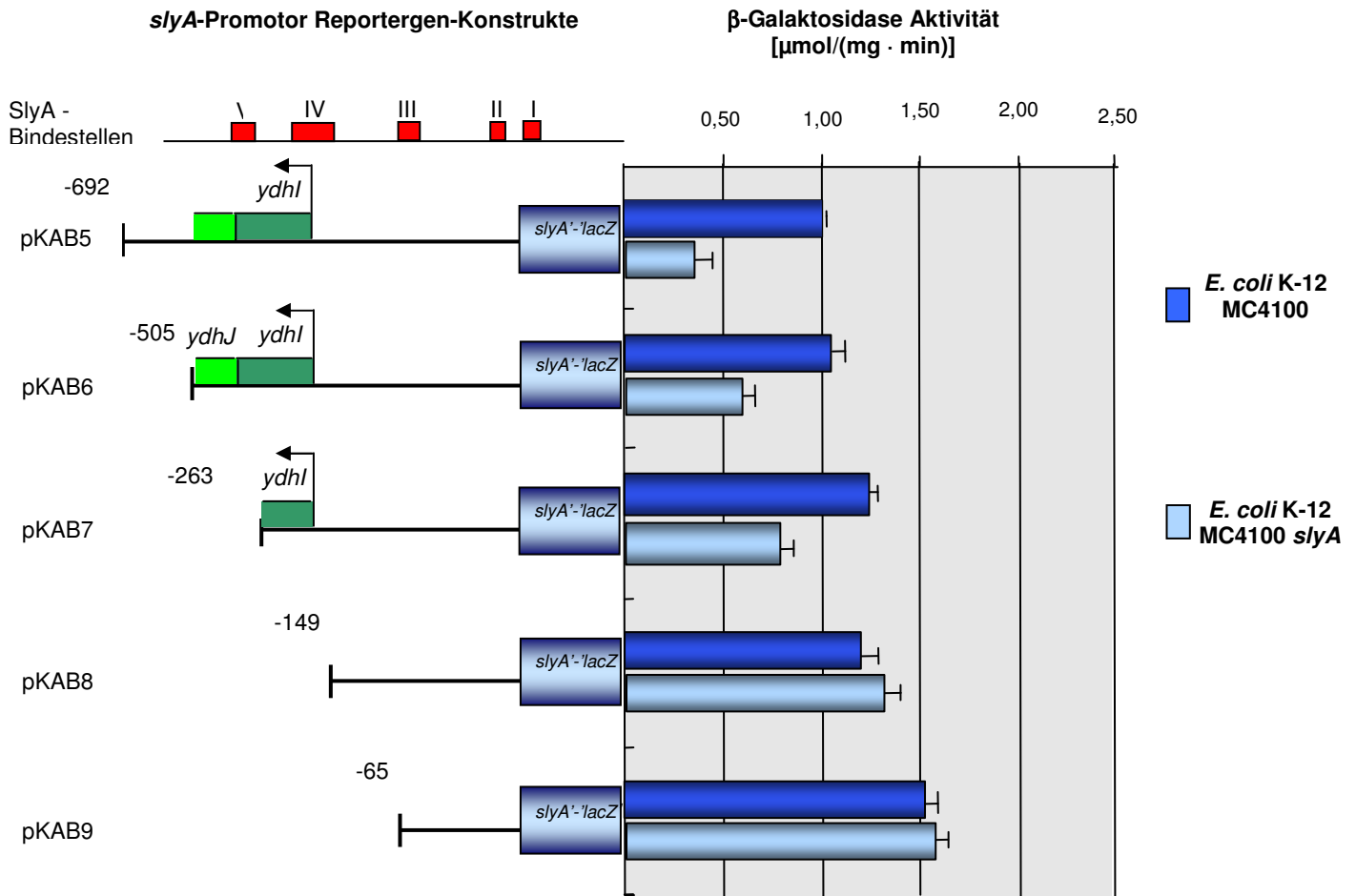
0,2  $\mu$ g der 5'-DIG-markierten Promotor-Fragmente (**A:** Primerpaar I70/I84, **B:** Primerpaar I60/I71, **C:** Primerpaar I273/443, **D:** Primerpaar I347/443) wurden mit aufsteigender SlyA-Proteinmenge (von 0,1 bis 9  $\mu$ M SlyA) inkubiert. Die geschützten Bereiche sind durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet, hypersensitive Bereiche durch eine Pfeilspitze. Die Sequenz dieser Bereiche kann anhand der mit aufgetrennten Sequenzreaktion zugeordnet werden, die mit demselben DIG-markierten Oligonukleotid amplifiziert wurde wie das zugehörige DNA-Fragment.

### 3.4.3 Promotordeletionsanalyse von P<sub>slyA</sub>

Um die Funktion der verschiedenen SlyA-Bindestellen bei der *slyA*-Regulation aufzuklären und den Einfluss des *ydhlJK*-Operons auf die *slyA*-Transkription zu untersuchen, wurde eine Serie von *slyA*'-'*lacZ*-Reporterergen-Fusionen generiert. Der Vergleich der Konstrukte in An- und Abwesenheit von SlyA in *E. coli* K-12 lässt Rückschlüsse auf den Einfluss der einzelnen Bindestellen auf die Promotoraktivität zu. Dazu wurden stückweise verkürzte Sequenzen des 5'-regulatorischen Bereiches von *slyA* aus *E. coli* K-12 MC4100 an das Reporterergen *lacZ* in Vektor pJL28 fusioniert, beginnend mit der Position -692 bis zu Position -65 relativ zum Transkriptionsstart. Folgende Konstrukte wurden generiert und verwendet: pKAB5 (Position -692 bis +420, Primer 162/252); pKAB6 (Position -505 bis +420, Primer 781/252); pKAB7 (Position -263 bis +420, Primer 783/252); pKAB8 (Position -149 bis +420, Primer I313/252) und pKAB9 (Position -65 bis +420, Primer I314/252). Die *slyA*'-'*lacZ* Reporterergen-Konstrukte wurden anschließend durch Restriktion mithilfe der Enzyme *SmaI* und *DraI* in den "low-copy"-Vektor pHSG575 umklontiert. Die transkriptionelle Aktivität wurde anhand der Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gemessen. Die schematische Darstellung der Konstrukte sowie deren Einfluss auf die Promotoraktivität sind Abb. 3.12 zu entnehmen.

Die sukzessive 5'-Deletion des Promotorbereichs mit der stromaufwärts gelegenen *ydhlJ*-Sequenz führte zu einem kontinuierlichen Anstieg der *slyA*-Expression. Dies deutet darauf hin, dass das *ydhlJK*-Operon die *slyA*-Expression negativ beeinflusst. Dieser Effekt wurde sowohl im Wildtyp als auch in der *slyA*-Mutante beobachtet. Die maximale Expression wurde durch die Deletion des Promotors bis zur Position -65 erreicht. Dieses Konstrukt wurde im Wildtyp 1,5fach stärker als die längste Fusion exprimiert, in der Mutante 4fach stärker.

Vergleicht man die Expression in Wildtyp und Mutante miteinander, wird deutlich, dass der positiv regulatorische Einfluss von SlyA auf seine eigene Genexpression vor allem auf die stromaufwärts gelegenen Bindestellen wirkt, da die Expression des längsten Konstruktes in der *slyA*-Mutante vollständig reprimiert wurde. Durch eine Deletion der Region stromaufwärts von -149 geht die SlyA-Abhängigkeit des Promotors verloren. Dieser stromaufwärts gelegene Bereich, in dem das *ydhlJK*-Operon lokalisiert ist und in dem Bindestelle V und ein Teil von Bindestelle IV liegen, scheint bei der Autoaktivierung eine wichtige Rolle zu spielen.



**Abb. 3.12:** Promotoraktivität der 5'-Deletionskonstrukte in Wildtyp und *slyA*-Mutante von *E. coli* K-12 MC4100

Der linke Teil der Abbildung zeigt schematisch die Struktur der *slyA-lacZ*-Reporter-Gen-Konstrukte, die Zahlen geben den Beginn der fusionierten Promotorsequenz in Relation zum Transkriptionsstart an. In rot sind die SlyA-Bindestellen relativ zum Transkriptionsstart dargestellt. Der rechte Teil zeigt die Ergebnisse der Messung der β-Galaktosidase-Aktivität und reflektiert die Promotoraktivität des betreffenden Konstruktes. Die Konstrukte wurden in *E. coli* K-12 MC4100 und den isogenen *slyA*-Stamm eingebracht, die resultierenden Transformanten über Nacht bei 37°C angezogen und die Enzym-Aktivität der β-Galaktosidase bestimmt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, die jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt wurden, und sind in μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> angegeben.

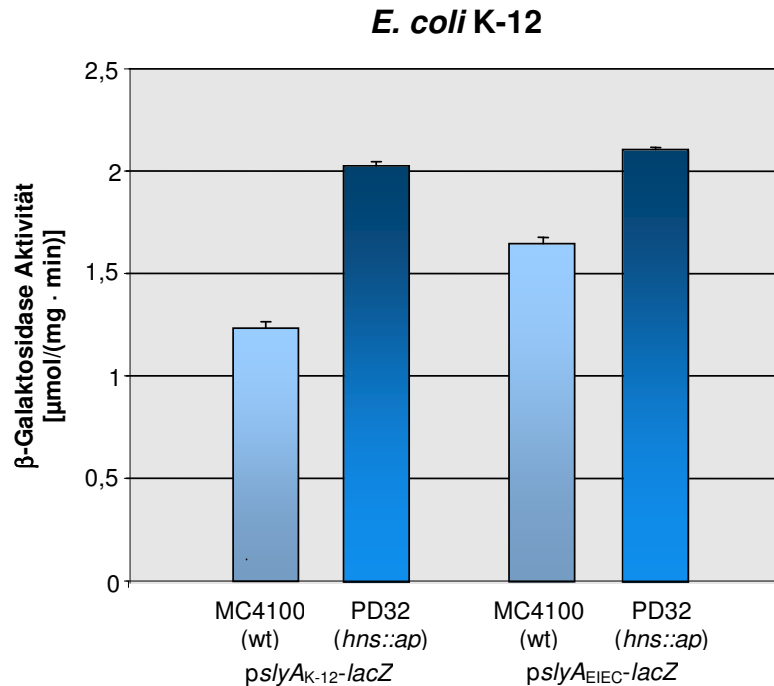
### 3.5 Regulatoren der *slyA*-Expression

Im folgenden Abschnitt wurden Faktoren hinsichtlich ihres Einflusses auf die *slyA*-Regulation in *E. coli* untersucht, von denen bekannt ist, dass sie in die Regulation von anderen Mitgliedern der MarR-Familie involviert sind, insbesondere von RovA in *Yersinia* und SlyA in *Salmonella*.

#### 3.5.1 Einfluss des Nukleoid-assoziierten Proteins H-NS auf die *slyA*-Expression

Das Nukleoid-assoziierte Protein H-NS ist unter enterischen Bakterien weit verbreitet und in die Organisation des bakteriellen Chromosoms involviert (Dorman, 2004). Durch die Veränderung der DNA-Topologie von spezifischen Loci moduliert es die Transkription (Blot *et al.*, 2006). H-NS liegt in niedriger Konzentration hauptsächlich als Dimer vor, kann aber zu höhergeordneten Komplexen multimerisieren (Ceschini *et al.*, 2000; Smyth *et al.*, 2000), die Brücken zwischen benachbarten DNA-Helices bilden. Es bindet bevorzugt an Sequenzen, die durch größeren AT-Reichtum gegenüber dem übrigen Genom als Fremd-DNA gekennzeichnet sind und legt diese durch die Brückenbildung still („xenogenix silencing“) (Lucchini *et al.*, 2006; Navarre *et al.*, 2006; Dorman, 2007b; Navarre *et al.*, 2007): Wie in Eukaryoten wird die DNA durch die Bildung des Nukleo-Protein-Komplexes unzugänglich für sequenzspezifische DNA-Bindeproteine wie die RNA-Polymerase, so dass die Transkription nicht stattfinden kann.

Um den Einfluss von H-NS auf die *slyA*-Expression in *E. coli* zu untersuchen, wurde die Aktivität von zwei *slyA*'-'*lacZ* Reporterfusionen vergleichsweise in *E. coli* K-12 MC4100 und in PD32 untersucht, einem Derivat von MC4100, dessen *hns* Allel durch die Insertion einer Ampicillin-Resistenzkassette zerstört wurde. Eine Fusion beinhaltete den 5'-regulatorischen Bereich von *slyA* aus *E. coli* K-12 CC118 $\lambda$ pir, die andere den aus EIEC 12860. Beide Fusionen wurden durch die Mutation des *hns*-Gens geringfügig induziert (siehe Abb. 3.13), diejenige aus *E. coli* K-12 1,6fach, die aus EIEC 1,3fach.



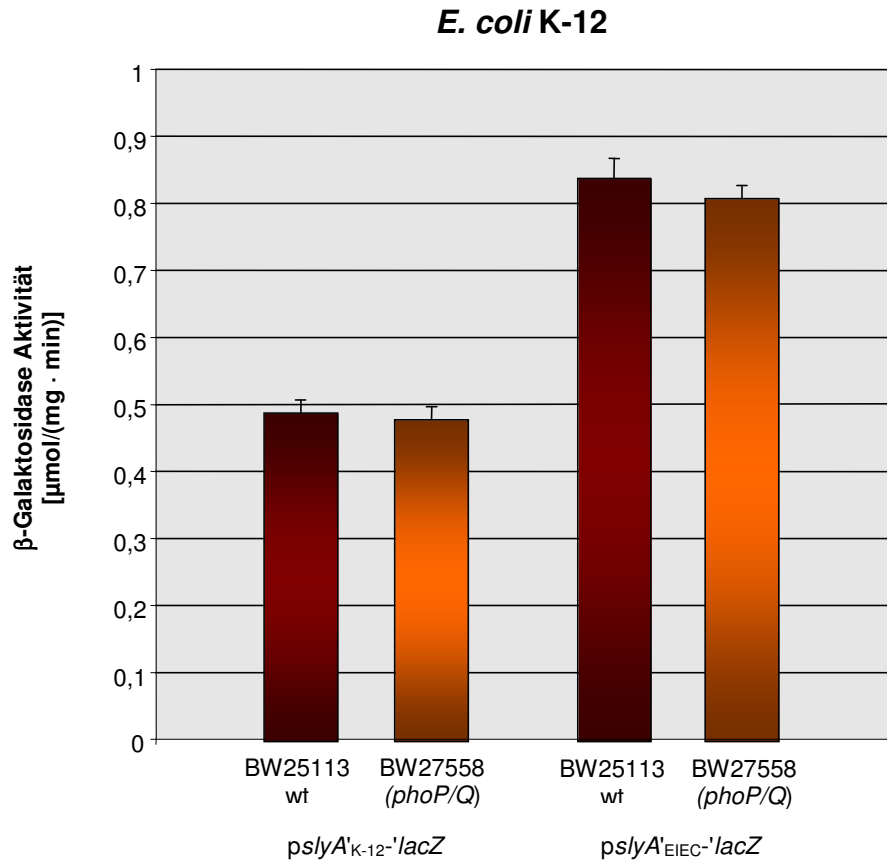
**Abb. 3.13:** Promotoraktivität von *pslYA<sub>K-12</sub>'-lacZ* und *pslYA<sub>EIEC</sub>'-lacZ* in Wildtyp und *hns*- Mutante von *E. coli* K-12 MC4100

Die Plasmide pAW20 (*slyA<sub>K-12</sub>'-lacZ*) und pAW22 (*slyA<sub>EIEC</sub>'-lacZ*) wurden in *E. coli* K-12 MC4100 und den isogenen *hns* Stamm PD32 eingebracht. Die resultierenden Stämme wurden über Nacht bei 37°C angezogen und die Enzym-Aktivität der β-Galaktosidase bestimmt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, die jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt wurden, und sind in  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  angegeben.

### 3.5.2. Einfluss des Zwei-Komponenten-Systems PhoP/Q auf die *slyA*-Expression

Das Zwei-Komponenten-System PhoP/Q kontrolliert in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium die Expression vieler Gene, die in die Virulenz oder Anpassung an  $\text{Mg}^{2+}$ -limitierende Bedingungen involviert sind. Zu ihnen gehört auch das *slyA*-Gen, dessen zweiter, stromaufwärts gelegener Promotor durch PhoP aktiviert wird. Um die PhoP-abhängige *slyA*-Expression in *E. coli* zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit *lacZ*-Fusionen des *slyA*-Promotors aus *E. coli* K-12 und EIEC in einen *phoPQ*-defizienten Stamm von *E. coli* K-12 eingebracht und ihre Expression mit der im Wildtyp verglichen. Aus Abb. 3.14 ist ersichtlich, dass PhoP/Q in *E. coli* im Gegensatz zu *Salmonella* nicht an der Regulation der *slyA*-Transkription beteiligt ist, da sich eine Deletion dieses Zwei-Komponenten-Systems weder auf die Expression des *slyA*-Gens aus *E. coli* K-12 noch auf die des Gens aus EIEC 12860 auswirkte. Da in *Salmonella* nur der stromaufwärts gelegene Transkriptionsstart von PhoP beeinflusst wird und dieser in *E. coli* K-12 und EIEC nicht nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 3.2), ist hierin vermutlich der Unterschied in der *slyA*-Regulation zwischen *Salmonella* und *E. coli* begründet.





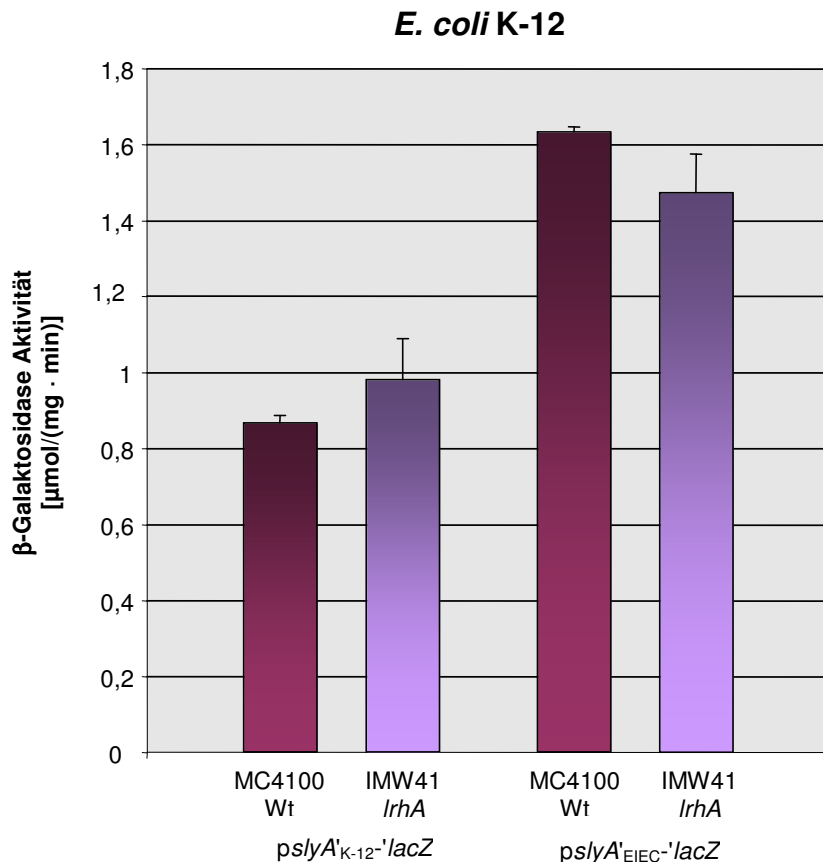
**Abb. 3.14:** Promotoraktivität von  $pslyA'_{K-12}$ - $lacZ$  und  $pslyA'_{EIEC}$ - $lacZ$  in Wildtyp und  $phoP/Q$ -Mutante von *E. coli* K-12 BW25113

Die Plasmide pAW20 ( $slyA'_{K-12}$ - $lacZ$ ) und pAW22 ( $slyA'_{EIEC}$ - $lacZ$ ) wurden in *E. coli* K-12 BW25113 und dessen  $phoP/Q$ -defizientes Derivat BW27558 transformiert. Die Transformanten wurden über Nacht bei 37°C angezogen. Die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase wurde in Doppelbestimmung in drei unabhängigen Messungen ermittelt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte dieser Messungen und sind in  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  angegeben.

### 3.5.3. Rolle des LysR-Regulators LrhA bei der Expression von *slyA*

Der globale Transkriptionsregulator LrhA (LysR Homolog A) in *E. coli* gehört zum LysR-Typ und reguliert Gene, die in die Motilität, Chemotaxis und Flagellensynthese von *E. coli* involviert sind (Lehnen *et al.*, 2002). Diese Gene bilden ein Regulon bestehend aus mindestens 13 hierarchisch geordneten Operons, die auf höchster Ebene dem Hauptregulator FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> unterstehen (Bartlett *et al.*, 1988; Liu & Matsumura, 1994, Prüß *et al.*, 2001). LrhA interagiert ausschließlich mit dem Promotor des Hauptregulators und seinem eigenen Promotor direkt und übt auf die hierarchisch untergeordneten Gene einen indirekten Effekt über FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> aus (Lehnen *et al.*, 2002). Beide Regulatoren kontrollieren darüber hinaus weitere Gene getrennt voneinander, im Fall von LrhA sind dies Fimbrien-Gene. Da auch SlyA in *E. coli* eine Reihe von Motilitäts- und Chemotaxisgenen beeinflusst (Simms & Mobley, 2008), lag die Vermutung nahe, dass LrhA die Kontrolle über einen Teil seines

Regulons durch SlyA ausübt. Um diese These zu prüfen, wurde der Effekt einer *lrhA*-Deletion auf die Expression der beiden Reportergenfusionen *slyA<sub>K-12</sub>'-lacZ* (pAW20) und *slyA<sub>EIEC</sub>'-lacZ* (pAW22) untersucht (Abb. 3.15). In beiden Experimenten konnte kein Einfluss von LrhA auf die *slyA*-Transkription beobachtet werden.



**Abb. 3.15:** Analyse der *slyA*-Expression in einer *E. coli* *lrhA*-Mutante

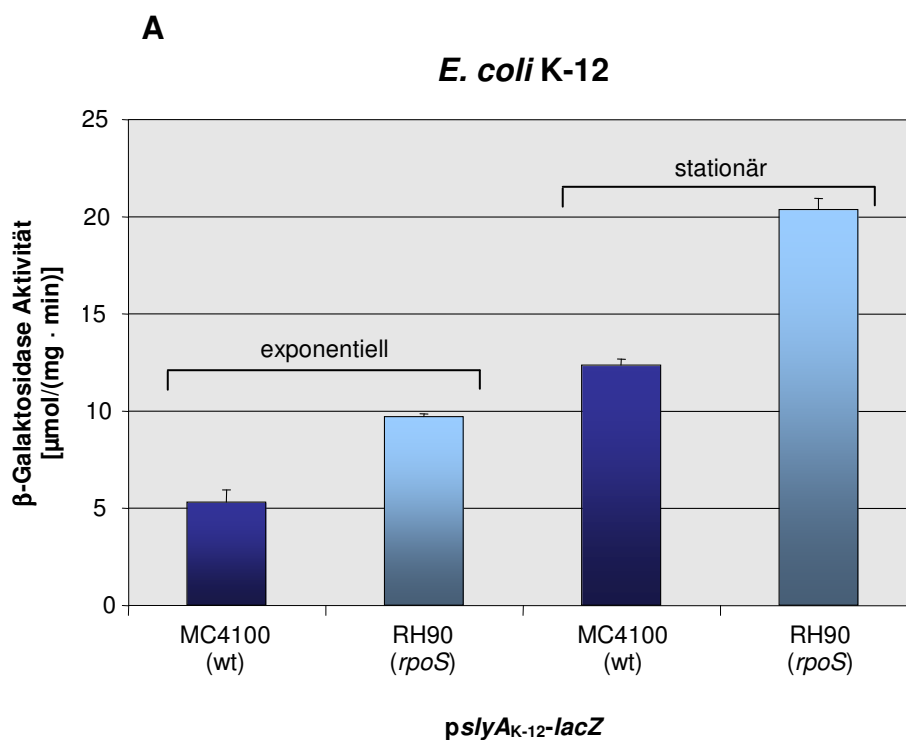
Die Reportergen-Konstrukte pAW20 (*slyA'<sub>K-12</sub>'-lacZ*) und pAW22 (*slyA'<sub>EIEC</sub>'-lacZ*) wurden in den Wildtyp von *E. coli* K-12 MC4100 und die isogene *lrhA*-Mutante IMW41 transformiert. Die so generierten Stämme wurden bei 37 °C in LB-Medium über Nacht angezogen und ein  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäts-Assay durchgeführt. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde dreifach als Doppelbestimmung gemessen und ist in  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  angegeben.

### 3.5.4 Einfluss des alternativen Sigmafaktors RpoS auf die SlyA-Synthese

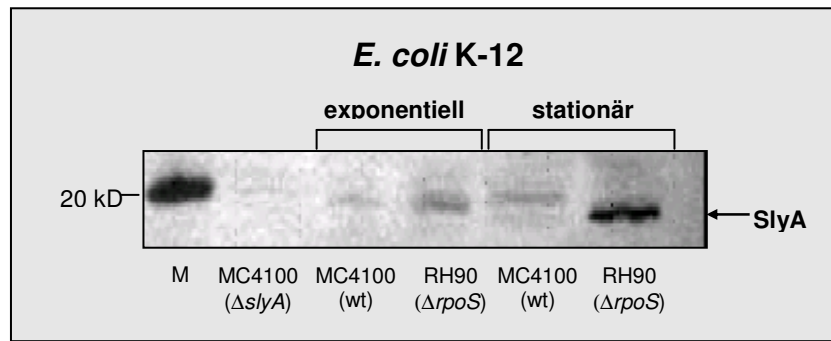
RpoS ( $\sigma^S$ ) stellt eine alternative Sigma-Untereinheit der RNA-Polymerase in *E. coli* dar, die den vegetativen Sigmafaktor RpoD ( $\sigma^{70}$ ) unter Stressbedingungen ersetzen kann. Aufgrund seiner essentiellen Funktion in der stationären Phase und bei der Antwort auf eine Vielzahl unterschiedlicher Stresstypen gilt RpoS als Hauptregulator der sogenannten generellen Stressantwort. Diese präventive Form der Stressantwort verleiht den Zellen eine umfangreiche Resistenz und schützt sie so vor Schäden unterschiedlicher Ursache.

Dementsprechend gehören zum RpoS-Regulon größtenteils Gene zum Schutz vor oxidativem-, UV-, Hitze-, Osmo- und Säurestress (McCann *et al.*, 1991; Hengge-Aronis *et al.*, 1993; Lange & Hengge-Aronis, 1994), aber auch Gene, die die Morphologie und den Metabolismus beeinflussen (Bishop *et al.*, 1998) sowie eine Anzahl an Virulenzgenen in enteropathogenen Bakterien (Hengge-Aronis, 2000).

Letzterer Umstand sowie die maximale Expression von *slyA* bei niedrigem pH und während der stationären Phase (siehe Abb. 3.3) sprachen für eine Funktion dieses globalen Regulators in der *slyA*-Transkription. Um diese These zu testen, wurde der Effekt einer *rpoS*-Deletion auf die Expression des Reporter-gen-Konstruktes *slyA<sub>K-12</sub>-lacZ* im low-copy Vektor pHSG575 (pAW20) in *E. coli* K-12 MC4100 untersucht. Es stellte sich heraus, dass RpoS einen reprimierenden Einfluss auf die *slyA*-Transkription ausübt. Die Deletion von RpoS bewirkte eine Verdoppelung der *slyA*-Expression in exponentiellen Zellen, in stationären Zellen war die Expression in der *rpoS*-Mutante gegenüber dem Wildtyp 1,7fach erhöht. Um diese Beobachtung zu bestätigen, wurden die SlyA-Mengen in Ganzzelextrakten von exponentiell und stationär gewachsenen Zellen von *E. coli* K-12 MC4100 Wildtyp und der isogenen *rpoS*-Mutante mittels Westernblot-Analyse untersucht. In der *rpoS*-Mutante wurde eine signifikant höhere SlyA-Menge nachgewiesen als im Wildtyp (siehe Abb. 3.16B). Dieser Effekt war in der stationären Phase, in der beide Regulatoren maximal exprimiert werden, am stärksten.



**B**



**Abb. 3.16:** Derepression der *slyA*-Expression in *E. coli* K-12 MC4100 durch Deletion von *rpoS*

**A:** Das auf Plasmid pAW20 kodierte Reportergenkonstrukt *slyA*<sub>K-12</sub>'-lacZ wurde in den Wildtyp und die *rpoS*-Mutante RH90 von *E. coli* K-12 MC4100 transformiert. Die Transformanten wurden über Nacht bei 37°C angezogen. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte aus drei Messungen der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität, die jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt wurden, und sind in  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  angegeben.

**B:** Wildtyp und *rpoS*-Mutante von *E. coli* K-12 MC4100 wurden in LB Medium bei 37°C kultiviert und in der exponentiellen und stationären Phase geerntet. Von gleichen Zellzahlen ausgehend wurden Ganzzellextrakte gewonnen, die Proteine in einem 15% Gel mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon-Membran transferiert. Das SlyA-Protein (Pfeil) wurde durch einen polyklonalen SlyA-Antikörper visualisiert. Größe und Position der Standard-Proteine sind in der linken Spur angezeigt (M). Ein *slyA*-defizienter *E. coli* K-12 Stamm wurde als Negativkontrolle in der zweiten Spur aufgetragen.

### 3.5.5 Die Heterogenität des RpoS-Spiegels in *E. coli* verursacht unterschiedliche *slyA* Expressionsraten

Die dem *rpoS*-Gen benachbarte chromosomale Region ist evolutionär hoch variabel und sowohl bei pathogenen als auch kommensalen *E. coli* Stämmen wurden mehrfach Mutationen des *rpoS*-Lokus beobachtet (Herbelin *et al.*, 2000). Z. B. wurde in einer EHEC EDL933 Variante eine Punktmutation detektiert, die zu einem frühzeitigen Abbruch der RpoS-Synthese führt (Coldewey *et al.*, 2007).

Aufgrund dieser beschriebenen häufig auftretenden Mutationen in *rpoS* lag eine Analyse der RpoS-Synthese sowie der *rpoS*-Aktivität in verschiedenen *E. coli* Stämmen nahe. Der RpoS-Spiegel wurde dazu in Ganzzellextrakten der apathogenen Stämme MC4100, MG1655, CC118 $\lambda$ pir und BL21 $\lambda$ DE3 sowie der klinischen Isolate EPEC JPN15, EPEC *stx* *eaec*, EIEC 12860, EIEC 78-5, EHEC EDL933, EHEC O103:H2 *stx1* *eaec*, EHEC O103:H7 *stx2* *eaec*, ETEC O6:H7 und EAEC immunologisch anhand eines polyklonalen, gegen RpoS gerichteten Antikörpers verglichen. Aus Abb. 3.17 A ist ersichtlich, dass in fast allen enteropathogenen Stämmen Abbruchprodukte, gar kein oder deutlich weniger RpoS detektierbar war als in den kommensalen *E. coli* Stämmen. Die apathogenen *E. coli* Varianten unterschieden sich hinsichtlich der RpoS-Synthese nicht deutlich voneinander und zwei pathogene Stämme

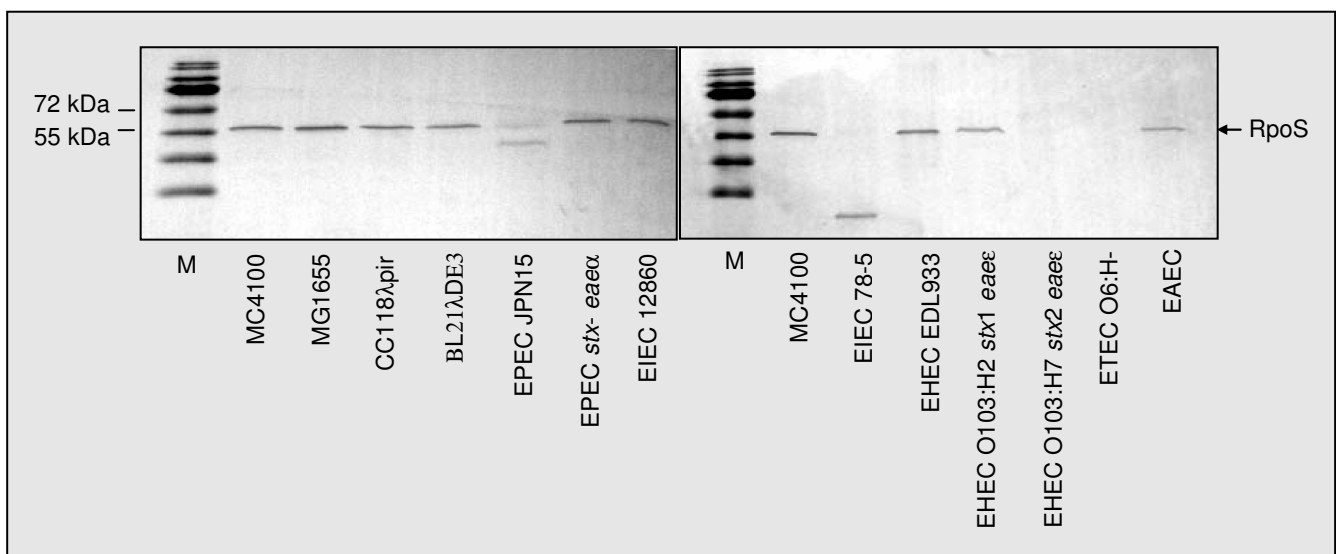
(EPEC *stx<sup>-</sup> eae* und EIEC 12860) lieferten dazu vergleichbare, relativ hohe RpoS-Mengen. Im Vergleich dazu weniger RpoS wurde in EHEC EDL933, EHEC O103:H2 *stx1 eae* und EAEC nachgewiesen. In EPEC JPN15 und EIEC 78-5 waren kleinere Abbruchprodukte erkennbar und in EHEC O103:H7 *stx2 eae* und ETEC O6:H<sup>-</sup> konnte überhaupt kein RpoS detektiert werden.

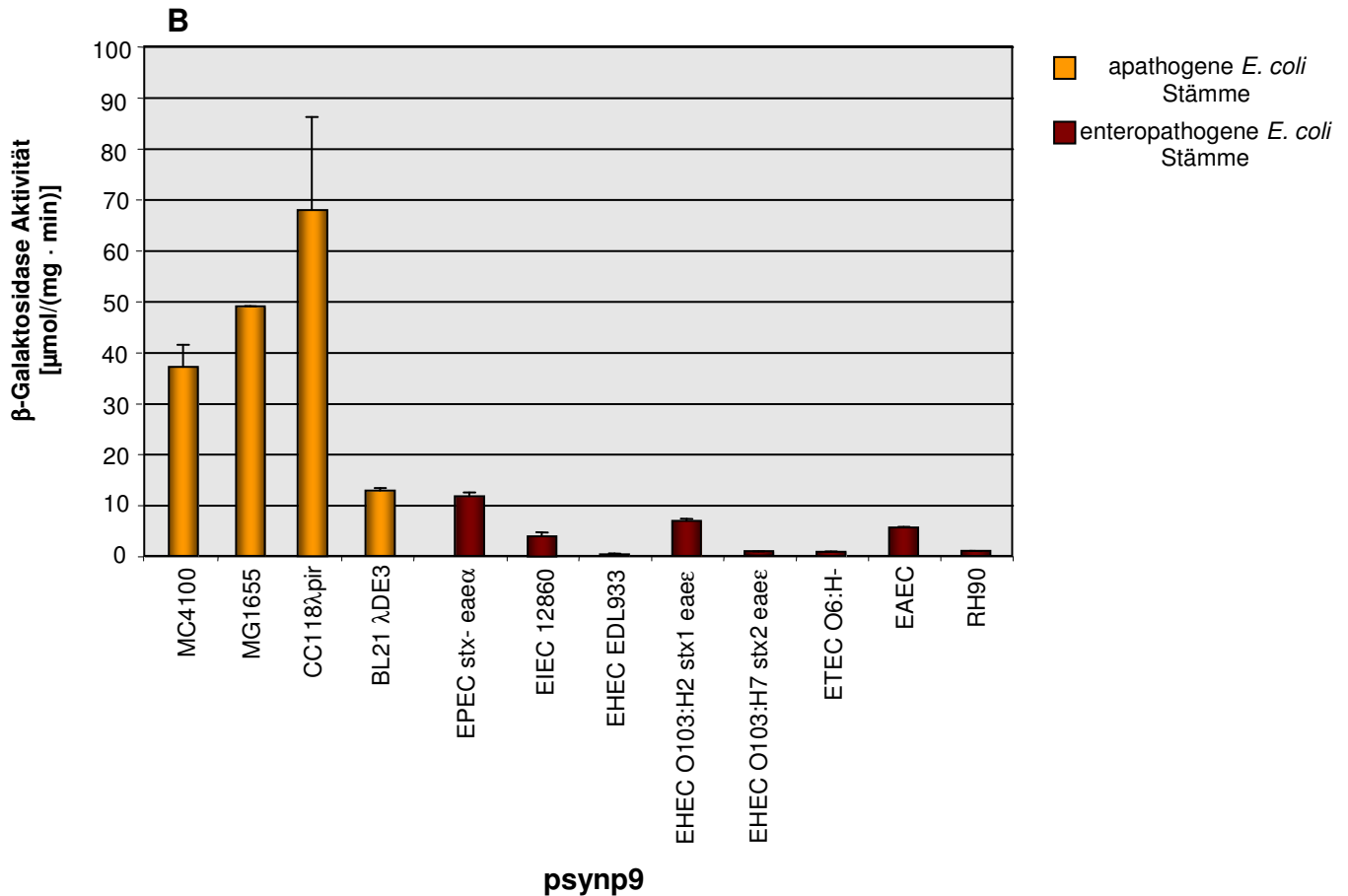
Da auch in den enteropathogenen Stämmen mit relativ hohem RpoS-Spiegel im Vergleich zu den kommensalen Stämmen trotzdem signifikant erhöhte SlyA-Mengen detektiert wurden (zu EIEC 12860 siehe Abb. 3.3, weitere Daten nicht gezeigt), sollte im nächsten Schritt die Aktivität der RpoS-Proteine untersucht werden. Dazu wurde das Plasmid psynp9 verwendet, das einen synthetischen, ausschließlich RpoS-abhängigen Promotor kodiert, dessen Expression folglich die RpoS-Aktivität direkt reflektiert.

Aus Abb. 3.17 B wird deutlich, dass die RpoS-Aktivität in den pathogenen *E. coli* Stämmen signifikant gegenüber den apathogenen reduziert ist. Es bestehen auch Unterschiede innerhalb der Gruppe der Kommensalen, die aus der Westernblot-Analyse nicht ersichtlich waren: Die höchste psynp9 Expressionsrate mit fast 70  $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$  zeigte CC118 $\lambda\text{pir}$ , gefolgt von MG1655 mit fast 50  $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$  und MC4100 mit 37  $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ . Im *E. coli* B Stamm BL21 $\lambda\text{DE3}$  war die Expression dagegen relativ niedrig und etwa auf dem Niveau des pathogenen Stammes EPEC *stx<sup>-</sup> eae*. In EHEC O103:H2 *stx1 eae*, EIEC 12860 und EAEC lag die Expression deutlich unter 10  $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ . In EHEC O103:H7 *stx2 eae*, ETEC O6:H<sup>-</sup> und EHEC EDL933 lag die Expressionsrate etwa bei der Negativkontrolle.

Diese Befunde belegen die Verbindung zwischen der unterschiedlichen Aktivität von RpoS in den pathogenen und apathogenen *E. coli* Stämmen und deren heterologer *slyA*-Expression.

**A**





**Abb. 3.17:** Heterogene RpoS-Synthese in *E. coli*

**A:** Die kommensalen *E. coli* Stämme MC4100, MG1655, CC118λpir und BL21λDE3 sowie die pathogenen Stämme EPEC JPN15, EPEC stx<sup>-</sup> eaeε, EIEC 12860, EIEC 78-5, EHEC EDL933, EHEC O103:H2 stx1 eaeε, EHEC O103:H7 stx2 eaeε, ETEC O6:H<sup>-</sup> und EAEC wurden in LB Medium bei 37°C kultiviert und in der stationären Phase geerntet. Die Proteine der Ganzzellextrakte wurden in einem 15% Gel mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon-Membran transferiert. Das RpoS-Protein (Pfeil) wurde durch einen polyklonalen RpoS-Antikörper visualisiert. Größe und Position der Standard-Proteine sind in der linken Spur angezeigt (M).

**B:** Plasmid psynp9, das einen synthetischen, ausschließlich RpoS-abhängigen Promotor kodiert, wurde in die apathogenen *E. coli* Stämme CC118λpir, MC4100, BL21λDE3, MG1655 und zur Kontrolle in den *rpoS*-defizienten Stamm RH90 sowie in die pathogenen *E. coli* Stämme EPEC stx<sup>-</sup> eaeα, EIEC 12860, EHEC EDL933, EHEC O103:H2 stx1 eaeε, EHEC O103:H7 stx2 eaeε, ETEC O6:H<sup>-</sup> und EAEC eingebracht. Die so generierten Stämme wurden über Nacht bei 37°C angezogen. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte aus drei Messungen der β-Galactosidase-Aktivität, die jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt wurden, und sind in μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> angegeben.

### 3.6. Definition des SlyA-Regulons

#### 3.6.1 Identifizierung putativer Mitglieder des SlyA-Regulons durch DNA-Chip Technologie

Durch Proteom-Technologie wurde bereits das SlyA-Regulon in EIEC und *Salmonella enterica* aufgeklärt (Spory *et al.*, 2002). Dabei zeigte sich, dass SlyA in beiden Stämmen die Synthese einer Vielzahl von Proteinen unterschiedlicher Funktion positiv wie auch negativ beeinflusst, und dass beide Regulons nicht identisch sind. Zum SlyA-Regulon in EIEC gehören Proteine, die die Resistenz des Bakteriums gegenüber Hitze- und Säurestress positiv beeinflussen, sowie ClyA, ein porenbildendes Hämolyisin, dessen Expression auch in *E. coli* K-12 durch Überexpression von SlyA induziert werden kann (Ludwig *et al.*, 1995; Oscarsson *et al.*, 1996; Lithgow *et al.*, 2007; diese Arbeit Abb. 3.1). Obwohl nicht als typische Virulenzfaktoren bekannt, könnten einige der in *Salmonella* als SlyA-abhängig identifizierten Proteine eine Rolle in der Virulenz spielen (Fang *et al.*, 1999). Dementsprechend ist die Virulenz einer *Salmonella slyA*-Mutante stark geschwächt (Navarre *et al.*, 2005) und die Genregulation durch SlyA für das intrazelluläre Überleben von EIEC und *Salmonella* serovar Typhimurium in phagozytotischen Wirtszellen erforderlich (Spory *et al.*, 2002). Mehrere der in EIEC identifizierten Gene haben kein Homolog in *Salmonella* und dies ist auch umgekehrt für ein *Salmonella*-Gen der Fall. Angesichts dieser großen Unterschiede der SlyA-Regulons stellt sich die Frage, ob in EHEC O157:H7 EDL933 als einem enterohämorrhagischen Stamm weitere/andere Virulenzgene SlyA-abhängig sind und ob SlyA in dem Kommensalen *E. coli* K-12 dagegen Haushaltsgene reguliert. Um diesen Ansatz zu verfolgen, wurde ein genomweiter Transkriptomvergleich dieser Stämme durchgeführt. Dabei wurde in zwei Ansätzen das Transkriptionsprofil einer *slyA*-Mutante sowie das eines *slyA*-überproduzierenden Derivates anhand der Gesamt-RNA mit dem jeweiligen Wildtyp *E. coli* K-12 (MC4100) bzw. EHEC EDL933 verglichen.

Für die RNA-Extraktion wurden die Stämme in LB-Medium angezogen. Um die Replikation des Plasmids pAW8 (*slyA*<sup>+</sup>) zur Überexpression von *slyA* zu gewährleisten, wurde dem Medium Chloramphenicol zugesetzt. Die Kulturen wurden aus Übernachtskulturen überimpft und in der frühen stationären Phase (bei einer OD von 1,5 – 2) geerntet, da die *slyA*-Expression in dieser Wachstumsphase maximal ist (A.-K. Wagner, Diplomarbeit). Von den RNA Proben wurden fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden synthetisiert und gleiche Mengen beider cDNA Proben zur Hybridisierung eingesetzt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 3.1-3.6 aufgelistet.

### 3.6.1.1 SlyA-regulierte Gene in *E. coli* K-12

Insgesamt zeigten 12 Gene in *E. coli* K-12 einen mindestens 1,5-fach erhöhten mRNA-Spiegel im Wildtyp verglichen mit der *slyA*-Mutante und sechs Gene einen erniedrigten (siehe Tabelle 3.1).

Tab. 3.1: Transkriptomvergleich von *E. coli* K-12 und *E. coli* K-12 *slyA*

Gene-ID	Symbol	Funktion <sup>b</sup>	Wildtyp versus $\Delta slyA$ <sup>a</sup>
<b>SlyA-induzierte Gene</b>			
B1642	<i>slyA</i>	Transkriptionaler Regulator für kryptisches Hämolyisin [BEZ]	2,98 +/- 1,41
B3509	<i>hdeB</i>	Periplasmatisches Säurestress Chaperon [BEZ]	2,91 +/- 1,59
B3113	<i>tdcF</i>	L-PSP (mRNA) Endoribonuklease [B]	2,59 +/- 0,67
B3510	<i>hdeA</i>	Periplasmatisches Säureresistenz Protein, vermutlich Chaperon [BEZ]	2,47 +/- 1,56
B3115	<i>tdcD</i>	Putative kinase [BEZ]	2,33 +/- 1,60
B0553	<i>nmpC</i>	Aussenmembran Porin Protein; Lokus des qsr Prophagep [BZ]	2,09 +/- 1,20
B1641	<i>slyB</i>	Putatives Aussenmembran Protein [BEZ]	1,94 +/- 1,31
B3111	<i>tdcG</i>	Putative L-Serin Dehydratase [B]	1,68 +/- 0,67
B4115	<i>adiC</i>	Putatives Aminosäure/Amin Transportprotein, kryptisch [B]	1,60 +/- 0,84
B2369	<i>evgA</i>	Putativer positiver Transkriptionsregulator (Sensor Evgs) [BEZ]	1,57 +/- 1,08
B3511	<i>hdeD</i>	Säureresistenz Protein, Membranprotein [BEZ]	1,54 +/- 0,90
B3117	<i>tdcB</i>	Threonin Dehydratase, katabol [BZ]	1,50 +/- 1,02
<b>SlyA-reprimierte Gene</b>			
B0014	<i>dnaK</i>	Chaperon hsp70; DNA Biosynthese; autoregulierte Hitzeschockprotein [BEZ]	-2,40 +/- 1,37
B0015	<i>dnaJ</i>	Hitzeschockprotein [BEZ]	-1,74 +/- 0,73
B4143	<i>mopA</i>	groEL, Chaperon hsp60, Peptid-abhängige ATPase, Hitzeschockprotein [BZ]	-1,67 +/- 1,08
B3365	<i>nirB</i>	Nitrit-Reduktase (NAD(P)H) Untereinheit [BEZ]	-1,66 +/- 1,25
B4142	<i>mopB</i>	groES, 10 kDa Chaperon bindet an hsp60 in Anwesenheit von mg-ATP, supprimiert dessen ATPase Aktivität [BZ]	-1,59 +/- 1,06
B3321	<i>rpsJ</i>	30s ribosomale Untereinheit, Protein s10 [BZ]	-1,55 +/- 0,97

a. Mittelwert von sechs biologischen Replikaten, dargestellt ist der Wert +/- Standardabweichung

b. *E. coli* K-12 spezifische Oligonukleotide sind durch das Acronym B gekennzeichnet, *E. coli* O157:H7 RIMD0509952/VT2 Sakai spezifische durch E und *E. coli* O157:H7 EDL 933 spezifische durch Z.

Das *hdeD*-Gen liegt nicht im selben Operon, jedoch benachbart zu *hdeAB*. Die Gene *nmpC* und *slyA* bilden jeweils eigene Transkriptionseinheiten, während *hdeAB* (*hdeAB-yhiD*) und *tdcB,D,F,G* (*tdcABCDEFG*) in Operonstrukturen organisiert sind, sowie vermutlich auch *evgA* (*evgAS*). *adiC*, *hdeD* und *slyB* bilden vermutlich auch eigene Einheiten. Abgesehen von SlyA



werden diese Gene von einer Vielzahl anderer Regulatoren beeinflusst, *hdeAB* und *-D* werden von TorR (Bordi *et al.*, 2003), GadX (Tucker *et al.*, 2003) und GadE (Hommais *et al.*, 2004) positiv reguliert und von H-NS (Shin *et al.*, 2005) und MarA (Schneider *et al.*, 2004) reprimiert. Das *tdcABCDEFG* Operon wird von Fnr (Constantinidou *et al.*, 2006), IHF, CRP und TdcR und TdcA aktiviert. *nmpC* wird ebenfalls von CRP aktiviert und von IHF und OmpR reprimiert. Einzig bisher bekannter Regulator von *slyB* ist PhoP (Minagawa 2003).

Die Gene *dnaKJ* bilden eine eigene, autoregulierte Transkriptionseinheit. Auch die *groS*- und *groL*-Gene bilden vermutlich ein Operon. Über die Regulatonsfaktoren ist bisher nichts bekannt. Das *nirB*-Gen ist als erstes Gen in dem Operon *nirBDC-cysG* lokalisiert. Positive Regulatoren sind Fnr, NarL (Darwin *et al.*, 1997; Wang & Gunsalus, 2000) und NarP (Darwin *et al.*, 1997; Wang & Gunsalus, 2000). Repressoren des Operons sind Fis (Browning *et al.*, 2000; 2004), H-NS (Browning *et al.*, 2000), FruR (Tyson *et al.*, 1997), CRP (Zheng, 2004) und IHF (Browning, 2000; 2004). Das *rpsJ*-Gen scheint ebenfalls in einem Operon organisiert zu sein (*rpIBCDPVW-rpmC-rpsCJQS*), das von Fnr aktiviert (Salmon *et al.*, 2003) und von ArcA (Salmon *et al.*, 2005) reprimiert wird.

Durch die Überexpression von *slyA* in *E. coli* K-12 wurde der mRNA-Spiegel von 20 Genen mindestens um den Faktor 1,5 erhöht und der von 37 Genen mindestens um diesen Faktor reduziert (siehe Tabelle 3.2).

Tab. 3.2: Transkriptomvergleich von *E. coli* K-12 und *E. coli* K-12 *pslyA*<sup>+</sup>

Gene-ID	Symbol	Funktion <sup>b</sup>	Wildtyp versus <i>pslyA</i> <sup>+</sup> <sup>a</sup>
<b><u>SlyA-induzierte Gene</u></b>			
B1182	<b><i>clyA</i></b> ( <i>hlyE</i> )	Hämolysin E /Cytolysin A [BEZ]	5,5 +/- 1,7
B1642	<b><i>slyA</i></b>	Transkriptionaler Regulator für kryptisches Hämolysin [BEZ]	4,1 +/- 1,1
B0813	<b><i>rhtA</i></b>	Threonin und Homoserin Exporter [B]	2,6 +/- 1,2
B3225	<b><i>nanA</i></b>	N-Acetylneuraminat Lyase (Aldolase); Katabolismus von Sialinsäure [BEZ]	2,4 +/- 1,4
B1959	<b><i>yedA</i></b>	putative Transmembran Untereinheit [BEZ]	2,3 +/- 1,4
B3593	<b><i>rhsA</i></b>	RhsA Protein im rhs Element [BEZ]	2,2 +/- 0,7
B4309	<b><i>yjhS</i></b>	orf, hypothetisches Protein [BEZ]	2,2 +/- 1,2
B1668	<b><i>ydhS</i></b>	Konserviertes Protein mit FAD/NAD(P)-Bindedomäne [B]	2,0 +/- 1,5
B2572	<b><i>rseA</i></b>	Sigma-Factor E, negativ regulatorisches Protein [BEZ]	1,9 +/- 1,2
B2573	<b><i>rpoE</i></b>	RNA Polymerase, Sigma-Faktor E; Hitzeschock und oxidativer Stress [BZ]	1,9 +/- 1,3
B0382	<b><i>iraP</i></b>	anti-Adapter Protein für s <sup>S</sup> stabilisierung [BEZ]	1,8 +/- 0,6

## Ergebnisse

B1643	<b><i>ydhl</i></b>	vermutetes inneres Membranprotein [B]	1,8 +/- 1,0
B0064	<b><i>araC</i></b>	transkriptionaler Regulator für <i>ara</i> operon [BEZ]	1,8 +/- 1,3
B1457	<b><i>ydcd</i></b>	orf, hypothetisches Protein [B]	1,7 +/- 1,1
B2704	<b><i>srlB</i></b>	PTS System, Glucitol/Sorbitol-spezifisches Enzym iia, Komponente [BZ]	1,6 +/- 0,8
B2706	<b><i>gutM</i></b>	Aktivator des Glucitol Operons [BEZ]	1,6 +/- 1,2
B1902	<b><i>yecI</i></b>	Ferritin-ähnliches Protein [BEZ]	1,6 +/- 1,2
B1836	<b><i>yebV</i></b>	orf, hypothetisches Protein [B]	1,5 +/- 0,9
B3221	<b><i>yhch</i></b>	orf, hypothetisches Protein [BEZ]	1,5 +/- 1,1
B4209	<b><i>ytfE</i></b>	In die Reparatur von stressgeschädigten Eisen-Schwefel-Clustern involviertes Protein [BZ]	1,5 +/- 1,1
<b><u>SlyA-reprimierte Gene</u></b>			
B0114	<b><i>aceE</i></b>	Pyruvat Dehydrogenase (Decarboxylase Komponente) [BEZ]	-3,6 +/- 0,6
B0723	<b><i>sdhA</i></b>	Succinat Dehydrogenase, Flavoprotein Untereinheit [BZ]	-2,5 +/- 0,3
B0729	<b><i>sucD</i></b>	Succinyl-CoA Synthetase, Alpha-Untereinheit [BZ]	-2,5 +/- 0,5
B0116	<b><i>lpdA</i></b>	Lipoamid Dehydrogenase (NADH); Komponente der 2-Oxodehydrogenase und des Pyruvat Komplexes; I-Protein des Glycine cleavage complex [BEZ]	-2,5 +/- 0,5
B3314	<b><i>rpsC</i></b>	30s ribosomale Untereinheit, Protein s3 [BZ]	-2,4 +/- 0,9
B0430	<b><i>cyoC</i></b>	Zytochrom o Ubiquinol Oxidase Untereinheit iii [BEZ]	-2,3 +/- 0,2
B0726	<b><i>sucA</i></b>	2-Oxoglutarat Dehydrogenase [BZ]	-2,2 +/- 0,3
B0727	<b><i>sucB</i></b>	2-Oxoglutarat Dehydrogenase (Dihydrolipoyltranssuccinase e2 Komponente) [BZ]	-2,2 +/- 0,3
B3313	<b><i>rplP</i></b>	50s ribosomale Untereinheit, Protein l16 [BZ]	-2,2 +/- 0,5
B0431	<b><i>cyoB</i></b>	Zytochrom o Ubiquinol Oxidase Untereinheit i [BEZ]	-2,0 +/- 0,3
B3318	<b><i>rplW</i></b>	50s ribosomale Untereinheit, Protein l23 [BZ]	-2,0 +/- 0,6
B0115	<b><i>aceF</i></b>	Pyruvate Dehydrogenase (Dihydrolipoyltransacetylase Komponente) [BEZ]	-2,0 +/- 1,0
B3604	<b><i>lldR</i></b>	transkriptionaler Regulator [BEZ]	-2,0 +/- 1,1
B1088	<b><i>yceD</i></b>	orf, hypothetisches Protein [BEZ]	-2,0 +/- 1,4
B3987	<b><i>rpoB</i></b>	RNA Polymerase, $\beta$ -Untereinheit [BZ]	-1,9 +/- 0,4
B3733	<b><i>atpG</i></b>	Membrangebundene ATP Synthase, f1 Sektor, $\gamma$ -Untereinheit [BZ]	-1,9 +/- 1,0
B3312	<b><i>rpmC</i></b>	50s ribosomale Untereinheit, Protein l29 [BZ]	-1,8 +/- 0,4
B0429	<b><i>cyoD</i></b>	Zytochrom o Ubiquinol Oxidase Untereinheit iv [BEZ]	-1,8 +/- 0,5
B0145	<b><i>dksA</i></b>	DnaK-Suppressor Protein [BZ]	-1,8 +/- 0,5
B0724	<b><i>sdhB</i></b>	Succinat Dehydrogenase, Eisen-Schwefel Protein [BZ]	-1,8 +/- 0,8
B0720	<b><i>gltA</i></b>	Citrat-Synthase [BZ]	-1,8 +/- 0,8
B3316	<b><i>rpsS</i></b>	30s ribosomale Untereinheit, Protein s19 [BZ]	-1,8 +/- 0,8
B3984	<b><i>rplA</i></b>	50s ribosomale Untereinheit, Protein l1, reguliert die Synthese von l1 und l11 [BZ]	-1,8 +/- 0,9
B3342	<b><i>rpsL</i></b>	30s ribosomale Untereinheit, Protein s12 [BZ]	-1,8 +/- 1,3
B3319	<b><i>rplD</i></b>	50s ribosomale Untereinheit, Protein l4, reguliert die Expression des s10 Operons [BZ]	-1,7 +/- 0,4

## Ergebnisse

B2796	<b><i>sdaC</i></b>	wahrscheinlich Serin-Transporter [BEZ]	-1,7 +/- 0,6
B3983	<b><i>rplK</i></b>	50s ribosomale Untereinheit, Protein I11 [BZ]	-1,7 +/- 0,8
B0030	<b><i>yaaF</i></b>	orf, hypothetisches Protein [BZ]	-1,7 +/- 0,9
B3340	<b><i>fusA</i></b>	GTP-bindendes Protein, Ketten-Elongations Faktor EF-G [BZ]	-1,7 +/- 1,3
B3317	<b><i>rplB</i></b>	50s ribosomale Untereinheit, Protein I2 [BZ]	-1,6 +/- 0,3
B3734	<b><i>atpA</i></b>	Membran-gebundene ATP Synthase, f1 Sektor, alpha-Untereinheit [BZ]	-1,6 +/- 0,3
B2352	<b><i>yfdI</i></b>	Putative Ligase [B]	-1,6 +/- 0,5
B1089	<b><i>rpmF</i></b>	50s ribosomale Untereinheit, Protein I32 [BZ]	-1,6 +/- 0,7
B3731	<b><i>atpC</i></b>	Membran-gebundene ATP Synthase, f1 Sektor, epsilon-Untereinheit [BZ]	-1,6 +/- 1,2
B1531	<b><i>marA</i></b>	Multiple Antibiotikaresistenz; transcriptionaler Aktivator von Verteidigungs-Systemen [BEZ]	-1,5 +/- 0,5
B3302	<b><i>rpmD</i></b>	50s ribosomale Untereinheit, Protein I30 [BZ]	-1,5 +/- 1,0
B2351	<b><i>yfdH</i></b>	putatives Glycan Biosynthese Enzym [B]	-1,5 +/- 1,1

a. Mittelwert von fünf biologischen Replikaten, dargestellt ist der Wert +/- Standardabweichung

b. *E. coli* K-12 spezifische Oligonukleotide sind durch das Acronym B gekennzeichnet, *E. coli* O157:H7 RIMD0509952/VT2 Sakai spezifische durch E und *E. coli* O157:H7 EDL 933 spezifische durch Z.

*slyA* ist positiv autoreguliert, wie aus dieser Arbeit bekannt ist, und die korrekte Detektion von *slyA* als SlyA-aktiviertes Gen bestätigte somit als interne Positiv-Kontrolle die Funktionalität des Assays.

Die Gene *rseA* und *rpoE* sind im selben Operon lokalisiert (*rpoE-rseABC*), dessen distaler Promotor vermutlich von CpxR reprimiert wird (De Wulf *et al.*, 2002). Die Gene *nanA* und *yhch* sind erstes und letztes Gen desselben Operons (*nanATEK-yhch*), dieses wird von CRP induziert (Kalivoda *et al.*, 2003) und von NanR reprimiert (Plumbridge & Vimr, 1999; Kalivoda *et al.*, 2003). Die Gene *srlB* und *gutM* (*srlAEBD-gutM-SrlR-gutQ*) werden von H-NS (White-Ziegeler *et al.*, 2007), GutM (Yamada & Saier, 1988) und CRP (Zheng *et al.*, 2004) aktiviert und von GutR reprimiert (Yamada & Saier, 1988). Aktivatoren des Gens *ytfE* sind NsrR (Filenko *et al.*, 2007) und wahrscheinlich Fnr (Justino *et al.*, 2006), Repressoren sind wahrscheinlich NarP und NarL (Rodionov *et al.*, 2005). Die Gene *clyA*, *slyA*, *yedA*, *araC*, *ydhS*, *yebV*, *yecL* und *iraP* bilden jeweils eine eigene Transkriptionseinheit. Das Hämolysegen *clyA* wird von SlyA (Lithgow *et al.*, 2007), Fnr (Wyborn *et al.*, 2004b) und CRP (Wyborn *et al.*, 2004b) aktiviert und von H-NS sowohl aktiviert als auch reprimiert (Lithgow *et al.*, 2007). Das *araC*-Genprodukt reguliert seine eigene Expression sowohl positiv als auch negativ: es aktiviert einerseits die Expression eines distalen Promotors (Reeder & Schleif, 1993; Niland *et al.*, 1996; Gallegos *et al.*, 1997) und reprimiert andererseits die eines proximalen Promotors (Lee *et al.*, 1992; Niland *et al.*, 1996; Seabold & Schleif, 1998). Über die Transkriptions-Regulatoren der anderen Gene ist nichts bekannt.

Die Gene *rhsA*, *ycdD* und *ydhI* sind zwar in Operons organisiert, aber wurden als deren einziger Vertreter detektiert (*rhsA-yiba*; *ydhIJK*; *rhsE-ycdD*). Über die Regulatoren ihrer Transkription ist ebenfalls nichts bekannt.

Die Gene *aceE,F* und *lpdA* sind im selben Operon lokalisiert (*pdhR-aceEF-lpdA*), ebenso *sdhA,B* und *sucA,B,D* (*sdhCDAB-sucABCD*), *cyoB,C,D* (*cyoABCD*) und *rplA,K* und *rpoB* (*rplKAJL-rpoBC*) sowie *rpsC,S* und *rplBDPW*, (*rpsJ-rplCDWB-rpsS-rplV-rpsC-rplP-rpmC-rpsQ*). Das *pdhR-aceEF-lpdA* Operon wird von CRP aktiviert (Quail *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2005) und von Fnr sowohl aktiviert als auch reprimiert (Quail *et al.*, 1994; Salmon *et al.*, 2003). Die Gene *aceEF* bilden auch eine kleinere Transkriptionseinheit unter negativer Kontrolle von Fnr und ArcA (Shalel-Levanon *et al.*, 2005). Das *sdhCDAB-sucABCD* Operon wird von Fur (Zhang, 2005) und CRP aktiviert, von ArcA aktiviert und reprimiert und von Fnr reprimiert. Die Gene *cyoABCD* bilden vermutlich ebenfalls ein Operon aus. Es wird von CRP und GadE aktiviert und von ArcA, PdhR, Fur und Fnr reprimiert. Regulatoren des *rplKAJL-rpoBC* Operons sind unbekannt. Das Operon *rpsJ-rplCDWB-rpsS-rplV-rpsC-rplP-rpmC-rpsQ* wird von Fnr aktiviert (Salmon *et al.*, 2003) und ArcA reprimiert (Salmon *et al.*, 2005).

Die Gene *lldR* (*lldPRD*), *sdaC* (*sdaCB*), *fusA* (*fusA-tufA*) und *yfdI* (*yfdGHI*) sind zwar in Operons organisiert, aber wurden als dessen einziger Vertreter detektiert. Das *lldPRD*-Operon ist negativ autoreguliert (Lynch & Lin, 1996) und wird von ArcA reprimiert (Lynch & Lin, 1996; Liu & Matsumura, 2004; Mondragon *et al.*, 2006) und von PdhR aktiviert (Lynch & Lin, 1996). Über Regulatoren des *sdaCB*, *fusA-tufA* und des *yfdGHI* Operons ist nichts bekannt.

*gltA*, *dksA* und *yaaF* sind eigenständige Transkriptionseinheiten, wobei über deren Transkriptions-Regulation nichts bekannt ist. Die *gltA*-Expression wird von ArcA reprimiert (Lynch, 1996; Salmon, 2005) und von IHF (Lynch & Lin, 1996) und CRP (Zheng *et al.*, 2004) aktiviert.

SlyA induziert und reprimiert in *E. coli* K-12 Gene für Transportproteine und Porine, in Kohlenhydrat-, Aminosäure- und Energiestoffwechsel involvierte Gene und Gene, die an Regulationsprozessen sowie an RNA- und Protein-Synthese beteiligt sind. Außerdem sind mehrere Stressgene SlyA-abhängig, wobei Säurestressgene ausschließlich positiv reguliert werden und Hitzeschockgene und Chaperone durchweg negativ. Mehrere ribosomale Proteine werden durch SlyA reprimiert und ein Virulenzfaktor ist SlyA-aktiviert.

Tab. 3.3: funktionelle Klassen der in *E. coli* K-12 SlyA-regulierten Gene

Funktionelle Klasse		wt vs. $\Delta slyA$	Regulation [+/-]	wt vs. Überexpression	Regulation [+/-]
1. Zellwand und zelluläre Prozesse	1.1 Membranproteine			<i>ydhI</i>	+
	1.2 Transport und Porine	<i>slyB</i>	+		
		<i>nmpC</i>	+		
				<i>rhtA</i>	+
				<i>srlB</i>	+
				<i>sdaC</i>	-
2. Metabolismus	2.1 Kohlenhydrate			<i>rhsA</i>	+
				<i>yfdH,I</i>	-
				<i>gltA</i>	-
				<i>sucA,B,D</i>	-
				<i>sdhA,B</i>	-
	2.2 Aminosäuren	<i>tdcB,D,F, G</i>	+		
				<i>lpdA</i>	-
	2.3 Nukleotide			<i>aceE,F</i>	-
				<i>yaaF</i>	-
	2.4 Phosphate			<i>atpA,C,G</i>	-
	2.5 Energiestoffwechsel			<i>nanA</i>	+
				<i>cyoB,C,D</i>	-
		<i>nirB</i>	-		

Funktionelle Klasse		wt vs. $\Delta slyA$	Regulation [+/-]	wt vs. Überexpression	Regulation [+/-]
3. Informationswege	3.1 Regulation	<i>slyA</i>	+	<i>slyA</i>	+
		<i>evgA</i>	+		
				<i>araC</i>	+
				<i>gutM</i>	+
				<i>iraP</i>	+
				<i>lldR</i>	-
				<i>dksA</i>	-
				<i>marA</i>	-
	3.2 RNA Synthese/ Transkription			<i>rpoE</i>	+
				<i>rpoB</i>	-
	3.4 Protein Synthese/Translation			<i>rseA</i>	+
				<i>fusA</i>	-
	3.4.1 Ribosomale Proteine	<i>rpsJ</i>	-	<i>rpsL</i>	-
				<i>rplA,B,D,K,P,W</i>	-
				<i>rpmC,D,F</i>	-
				<i>rpsC,S</i>	-
4. Adaptation	4.1 Säurestress	<i>adiC</i>	+		
		<i>hdeAB</i> , <i>hdeD</i>	+		
	4.2 Hitzeschock/ Chaperone	<i>dnaKJ</i>	-		
		<i>mopA,B</i>	-		
	4.3 Andere Stressarten			<i>ytfE</i>	+
5. Virulenz- Faktoren				<i>clyA</i>	+

Funktionelle Klasse		wt vs. $\Delta slyA$	Regulation [+/-]	wt vs. Überexpression	Regulation [+/-]
6. unkeannte Funktion				<i>ydcD</i>	+
				<i>yedA</i>	+
				<i>ydhS</i>	+
				<i>yebV</i>	+
				<i>yecI</i>	+
				<i>yhcH</i>	+
				<i>yjhS</i>	+
				<i>yceD</i>	-

+ : positive Regulation durch SlyA

- : negative Regulation durch SlyA

### 3.6.1.2 SlyA-regulierte Gene in EHEC O157:H7

Durch die Deletion von *slyA* in EHEC EDL933 wurde das Expressionsmuster kaum verändert. Lediglich der mRNA-Spiegel des Gens *gadX* ist 1,7fach erhöht und der der Gene Ecs4585 und Ecs4586 um den Faktor 1,9 reduziert. Das *gadX*-Gen kodiert einen Transkriptionsaktivator und bildet eine eigene Transkriptionseinheit, deren Expression durch GadE (Hommais *et al.*, 2004) aktiviert und durch H-NS (Giangrossi *et al.*, 2005), GadW, Fnr (Constantinidou *et al.*, 2006) und RutR (Shimada *et al.*, 2007) reprimiert wird. Die Sequenzen der Gene Ecs4585 und Ecs4586 kodieren hypothetische Proteine und sind überlappend in derselben Transkriptionseinheit (Ecs4588, Ecs4587, Ecs4586, Ecs4585, Ecs4584, Ecs4583, Ecs4582, Ecs4581) lokalisiert.

Tab. 3.4: Transkriptomvergleich von EHEC O157:H7 und EHEC O157:H7 *slyA*

Gene-ID	Symbol	Funktion <sup>b</sup>	Wildtyp versus $\Delta slyA$ <sup>a</sup>
<b><u>SlyA-induzierte Gene</u></b>			
ECS4396	<i>gadX</i>	putative ARAC-type regulatory protein [BEZ]	1,7 +/- 0,65
<b><u>SlyA-reprimierte Gene</u></b>			

## Ergebnisse

ECS4585	<b>ECS4585</b>	hypothetical protein [EZ]	-1,95 +/- 1,30
ECS4586	<b>ECS4586</b>	hypothetical protein [EZ]	-1,89 +/- 1,28

a. Mittelwert von sechs biologischen Replikaten, dargestellt ist der Wert +/- Standardabweichung

b. *E. coli* K-12 spezifische Oligonukleotide sind durch das Acronym B gekennzeichnet, *E. coli* O157:H7 RIMD0509952/VT2-Sakai spezifische durch E und *E. coli* O157:H7 EDL 933 spezifische durch Z.

Durch die Überexpression von *slyA* in EHEC EDL933 wurde der mRNA-Spiegel von 104 Genen mindestens um den Faktor 1,5 erhöht und der von 20 Genen mindestens um diesen Faktor reduziert. 55 positiv und sieben negativ durch SlyA regulierte Gene konnten keiner funktionellen Gruppe zugeordnet werden.

Tab. 3.5: Transkriptomvergleich von EHEC O157:H7 und EHEC O157:H7 *pslyA*<sup>+</sup>

Gene-ID	Symbol	Funktion	Wildtyp versus <i>pslyA</i> <sup>+</sup>
<b>SlyA-induzierte Gene</b>			
Z5162	<b>z5162</b>	hypothetisches Protein [EZ]	5,15 +/- 2,25
Z5127	<b>cesD</b>	Typ III Sekretionssystem, CesD Protein [EZ]	4,78 +/- 2,84
Z5111	<b>cesT</b>	CesT Protein [EZ]	4,64 +/- 2,58
Z5103	<b>escF</b>	Transport; Transport von großen Molekülen: Protein, Peptid- Sekretion, Nadel-Komponente des Typ III Sekretionssystems [EZ]	4,60 +/- 1,92
Z5126	<b>escC</b>	Typ III Sekretionssystem, EscC Protein [EZ]	4,57 +/- 2,64
Z5106	<b>espD</b>	sekretiertes Protein EspD [EZ]	4,40 +/- 2,57
ECS4581	<b>escT</b>	Typ III Sekretionssystem, EscT Protein [EZ]	4,30 +/- 1,79
Z5140	<b>ler</b>	Ler Protein [EZ]	4,26 +/- 1,30
Z5489	<b>z5489</b>	orf; unbekannte Funktion [Z]	4,24 +/- 1,32
Z5107	<b>espA</b>	EspA Protein [EZ]	4,21 +/- 2,33
Z5128	<b>z5128</b>	hypothetisches Protein [EZ]	4,16 +/- 2,83
Z5104	<b>Z5104</b>	hypothetisches Protein [EZ]	4,13 +/- 1,80
Z5115	<b>Z5115</b>	hypothetisches Protein [EZ]	4,12 +/- 0,90
Z5113	<b>Z5113</b>	hypothetisches Protein [EZ]	3,98 +/- 2,31
Z5112	<b>tir</b>	translozierter Intimin Rezeptor Tir [EZ]	3,98 +/- 2,34
Z5114	<b>z5114</b>	hypothetisches Protein [EZ]	3,95 +/- 1,81
Z5117	<b>z5117</b>	hypothetisches Protein [EZ]	3,95 +/- 2,21
ECS4587	<b>ECS4587</b>	hypothetisches Protein [EZ]	3,94 +/- 1,34
ECS4586	<b>ECS4586</b>	hypothetisches Protein [EZ]	3,90 +/- 1,68
Z5116	<b>sepQ</b>	Typ III Sekretionssystem, SepQ Protein [EZ]	3,88 +/- 2,56
Z5129	<b>z5129</b>	hypothetisches Protein [EZ]	3,87 +/- 2,33
Z5108	<b>sepL</b>	Typ III Sekretionssystem, SepL Protein [EZ]	3,83 +/- 1,76
Z5131	<b>z5131</b>	hypothetisches Protein [EZ]	3,82 +/- 0,63
ECS4584	<b>ECS4584</b>	hypothetisches Protein [EZ]	3,70 +/- 0,92
Z5163	<b>z5163</b>	hypothetisches Protein [EZ]	3,69 +/- 1,60
Z2657	<b>slyA</b>	transkriptionaler Regulator für kryptisches Hämolyisin [BEZ]	3,61 +/- 1,11
ECS4658	<b>ECS4658</b>	hypothetisches Protein [E]	3,58 +/- 0,93
Z5125	<b>sepD</b>	Typ III Sekretionssystem, SepD [EZ]	3,54 +/- 1,67



# Ergebnisse

Z5200	<b>z5200</b>	hypothetisches Protein [EZ]	3,52 +/- 1,42
ECS4333	<b>ECS4333</b>	hypothetisches Protein [EZ]	3,50 +/- 0,72
Z5120	<b>escV</b>	Typ III Sekretionssystem, EscV protein [EZ]	3,49 +/- 2,02
Z5122	<b>sepZ</b>	Typ III Sekretionssystem, SepZ protein [EZ]	3,45 +/- 1,56
Z5199	<b>z5199</b>	hypothetisches Protein [EZ]	3,44 +/- 1,48
Z5110	<b>intimin</b>	Gamma Intimin [EZ]	3,42 +/- 1,19
ECS4656	<b>ECS4656</b>	hypothetisches Protein [E]	3,41 +/- 2,33
ECS0814	<b>ECS0814</b>	putatives Aussenmembranprotein [EZ]	3,38 +/- 1,41
Z5105	<b>espB</b>	sekretiertes Protein EspB [EZ]	3,35 +/- 1,46
ECS4801	<b>ECS4801</b>	hypothetisches Membranprotein [EZ]	3,32 +/- 1,73
Z6024	<b>z6024</b>	hypothetisches Protein [EZ]	3,30 +/- 0,87
Z5102	<b>z5102</b>	hypothetisches Protein [EZ]	3,29 +/- 1,39
Z5490	<b>z5490</b>	orf; unbekannte Funktion [Z]	3,27 +/- 1,15
Z1628	<b>z1628</b>	orf; unbekannte Funktion [Z]	3,26 +/- 1,35
ECS4585	<b>ECS4585</b>	hypothetisches Protein [EZ]	3,13 +/- 1,53
Z5943	<b>z5943</b>	hypothetisches Protein [EZ]	3,05 +/- 0,75
Z5109	<b>escD</b>	Typ III Sekretionssystem, EscD Protein [EZ]	2,98 +/- 1,80
Z4177	<b>z4177</b>	orf; unbekannte Funktion [Z]	2,85 +/- 0,89
ECS1814	<b>ECS1814</b>	hypothetisches Protein [EZ]	2,69 +/- 1,68
Z3918	<b>z3918</b>	Chaperon-ähnliches Protein [EZ]	2,69 +/- 1,88
ECS2714	<b>ECS2714</b>	hypothetisches Protein [EZ]	2,63 +/- 1,30
ECS4582	<b>escS</b>	Typ III Sekretionssystem, EscS Protein [EZ]	2,54 +/- 1,46
Z5124	<b>escJ</b>	Typ III Sekretionssystem, EscJ Protein [EZ]	2,50 +/- 0,87
ECS1677	<b>clyA (hlyE)</b>	Hämolysin E [BEZ]	2,41 +/- 1,16
ECS2155	<b>ECS2155</b>	hypothetisches Protein [EZ]	2,39 +/- 0,56
B0114	<b>aceE</b>	Pyruvat Dehydrogenase (Decarboxylase Komponente) [BEZ]	2,34 +/- 1,35
Z2695	<b>ydhS</b>	konserviertes Protein mit FAD/NAD(P)-Bindedomäne [BEZ]	2,32 +/- 0,93
Z1286	<b>ycbQ</b>	putatives fimbrial-ähnliches Protein [BEZ]	2,26 +/- 1,10
ECS4666	<b>ECS4666</b>	putatives fimbriales Protein [EZ]	2,26 +/- 1,22
B2150	<b>mgIB</b>	Galactose-bindendes Transport-Protein; Rezeptor für Galactose [BEZ]	2,25 +/- 0,56
ECS0242	<b>rhsE</b>	RhsE Protein im rhs Element [BEZ]	2,25 +/- 0,91
ECS4978	<b>ECS4978</b>	hypothetisches Protein [E]	2,24 +/- 1,32
Z5522	<b>z5522</b>	putative Aminosäure-Amidohydrolase [EZ]	2,21 +/- 0,76
Z5123	<b>z5123</b>	hypothetisches Protein [EZ]	2,20 +/- 0,98
ECS0232	<b>ECS0232</b>	hypothetisches Protein [EZ]	2,18 +/- 1,46
Z3770	<b>yfgL</b>	putatives Membranprotein [BEZ]	2,14 +/- 0,53
B4381	<b>deoC</b>	2-Deoxyribose-5-Phosphat Aldolase [BEZ]	2,09 +/- 0,96
ECS3380	<b>ndk</b>	Nukleosid Diphosphat Kinase [BEZ]	2,08 +/- 0,82
B0430	<b>cyoC</b>	Zytochrom o Ubiquinol Oxidase Untereinheit III [BEZ]	2,03 +/- 0,80
B0431	<b>cyoB</b>	Zytochrom o Ubiquinol Oxidase Untereinheit I [BEZ]	2,01 +/- 0,55
Z1464	<b>stx2a</b>	Shiga-Toxin 2 Untereinheit A [EZ]	2,01 +/- 1,41
ECS0238	<b>ECS0238</b>	hypothetisches Protein [EZ]	1,99 +/- 1,06
ECS1821	<b>ECS1821</b>	hypothetisches Protein [E]	1,97 +/- 0,76
Z3050	<b>yedA</b>	putative Transmembran Untereinheit [BEZ]	1,97 +/- 1,31
ECS4592	<b>ECS4592</b>	hypothetisches Protein [E]	1,94 +/- 0,95
Z2077	<b>z2077</b>	Unbekanntes Protein kodiert durch Prophage CP-9330 [Z]	1,93 +/- 0,11

## Ergebnisse

Z2338	<b>z2338</b>	hypothetisches Protein [EZ]	1,91 +/- 0,69
Z2242	<b>z2242</b>	hypothetisches Protein [EZ]	1,91 +/- 0,82
ECS0233	<b>ECS0233</b>	hypothetisches Protein [EZ]	1,89 +/- 0,22
Z5119	<b>escN</b>	Typ III Sekretionssystem, EscN [EZ]	1,87 +/- 0,90
ECS4608	<b>ECS4608</b>	hypothetisches Protein [EZ]	1,85 +/- 0,50
Z4882	<b>z4882</b>	HicB-ähnliches Protein [EZ]	1,80 +/- 0,47
Z5924	<b>z5924</b>	orf; Unknown function [Z]	1,78 +/- 1,31
ECS4589	<b>ECS4589</b>	hypothetisches Protein [E]	1,76 +/- 0,69
Z3769	<b>yfgH</b>	putatives Aussenmembran-Lipoprotein [BEZ]	1,73 +/- 0,84
Z3192	<b>wbdR</b>	Acetyltransferase [EZ]	1,72 +/- 1,24
Z5121	<b>z5121</b>	hypothetisches Protein [EZ]	1,71 +/- 0,79
Z0948	<b>z0948</b>	putatives Membranprotein [EZ]	1,69 +/- 0,49
Z5155	<b>yicP</b>	Wahrscheinlich Adenin Deaminase (Synthese Xanthin) [BEZ]	1,69 +/- 1,22
ECS3776	<b>gcvT</b>	Aminomethyltransferase (T protein; Tetrahydrofolat-abhängig) des Glycin cleavage Systems [BEZ]	1,67 +/- 1,18
Z5889	<b>z5889</b>	orf; unbekannte Funktion [Z]	1,65 +/- 0,74
B3866	<b>yihI</b>	orf; hypothetisches Protein [BEZ]	1,65 +/- 1,02
Z0335	<b>z0335</b>	unbekanntes Protein kodiert von Prophage CP-933I [Z]	1,64 +/- 0,90
Z5203	<b>tnaA</b>	Tryptophanase [BEZ]	1,62 +/- 0,72
Z1448	<b>z1448</b>	regulatorisches Protein Cro des Bacteriophagen BP-933W [Z]	1,61 +/- 0,40
Z5245	<b>asnA</b>	Asparagin Synthetase A [BEZ]	1,61 +/- 0,65
Z0266	<b>z0266</b>	hypothetisches Protein [EZ]	1,61 +/- 0,71
Z5638	<b>ubiC</b>	Chorismat Lyase [BEZ]	1,59 +/- 0,63
ECS4665	<b>ECS4665</b>	putatives fimbriales Protein [EZ]	1,59 +/- 0,69
ECS5259	<b>ECS5259</b>	hypothetisches Protein [EZ]	1,56 +/- 1,01
B4349	<b>hsdM</b>	Wirts-Modification; DNA Methylase M [B]	1,55 +/- 0,80
Z5248	<b>kup</b>	Niedrig-affines Potassium Transport System [EZ]	1,52 +/- 0,59
Z2256	<b>z2256</b>	Unbekanntes Protein mit Rhs Element assoziiert [Z]	1,52 +/- 0,64
B4047	<b>yjbL</b>	orf; hypothetisches Protein [BEZ]	1,52 +/- 0,74
Z4487	<b>z4487</b>	N-Acetylgalactosamin-spezifisches PTS System Enzym IID Komponente [Z]	1,52 +/- 0,79
Z5135	<b>escR</b>	Typ III Sekretionssystem, EscR Protein [EZ]	1,52 +/- 0,88
<b><u>SlyA-reprimierte Gene</u></b>			
Z3462	<b>napG</b>	Ferredoxin-Typ Protein: Electronentransfer [BEZ]	-2,87 +/- 0,88
Z1810	<b>z1810</b>	hypothetisches Protein [EZ]	-2,38 +/- 1,75
ECS2264	<b>ECS2264</b>	hypothetisches Protein [EZ]	-2,35 +/- 1,73
B4129	<b>lysU</b>	Lysin tRNA Synthetase; induzierbar; Hitzeschockprotein [BEZ]	-2,24 +/- 0,83
Z1034	<b>dps</b>	globaler Regulator; Unterversorgungs-Bedingungen [BEZ]	-2,22 +/- 1,29
Z1062	<b>bssR</b>	Regulator der Biofilm-Bildung (B0836) [BEZ]	-2,21 +/- 1,63
ECS1591	<b>ECS1591</b>	putative prohead Protease [EZ]	-2,11 +/- 1,45
Z3242	<b>z3242</b>	orf; unbekannte Funktion [Z]	-1,96 +/- 1,33
ECS1315	<b>ECS1315</b>	hypothetisches Protein [E]	-1,88 +/- 1,34
ECS2241	<b>ECS2241</b>	putatives Phagenschwanz-Protein [EZ]	-1,82 +/- 1,25
Z2624	<b>hdhA</b>	NAD-abhängige 7alpha-hydroxysteroid Dehydrogenase, Dehydroxylierung von Gallensäure; hdhA [BEZ]	-1,75 +/- 0,74

## Ergebnisse

Z2927	<b>cutC</b>	Kupfer Homöostasis-Protein [BEZ]	-1,75 +/- 1,08
B4155	<b>yjeA</b>	putative Lysyl-tRNA Synthetase [BEZ]	-1,74 +/- 1,26
Z5782	<b>hflC</b>	Protease spezifisch für Phage lambda cII Repressor [BEZ]	-1,73 +/- 1,28
ECS0500	<b>cof</b>	orf; hypothetisches Protein [BEZ]	-1,70 +/- 0,73
Z0106	<b>lpxC</b>	UDP-3-O-acyl N-Acetylglucosamin Deacetylase; Lipid A Biosynthese [BEZ]	-1,70 +/- 0,82
ECS1453	<b>flgD</b>	Flagellare Biosynthese; Initiierung des Haken-Zusammenbaus [BEZ]	-1,68 +/- 0,83
Z2309	<b>z2309</b>	hypothetisches Protein [EZ]	-1,64 +/- 1,16
Z1715	<b>flgF</b>	Flagellare Biosynthese; zellnaher Teil des Basalkörper-Stiftes; [BEZ]	-1,61 +/- 0,57
Z3012	<b>fliA</b>	Flagellare Biosynthese; alternativer Sigma Faktor 28; Regulation des Flagellen-Operons [BEZ]	-1,56 +/- 0,95

a. Mittelwert von sechs biologischen Replikaten, dargestellt ist der Wert +/- Standardabweichung

b. *E. coli* K-12 spezifische Oligonukleotide sind durch das Acronym B gekennzeichnet, *E. coli* O157:H7 RIMD0509952/VT2-Sakai spezifische durch E und *E. coli* O157:H7 EDL 933 spezifische durch Z.

Alle Gene der Transkriptionseinheiten *escF-espABD-z5104-z5102 z5199-z5200* und *sepQ-z5117-z5115* wurden als SlyA-aktiviert detektiert.

Aus dem Operon (ECs4588-ECs4587-ECs4586-ECs4585-ECs4584-ECs4583-ECs4582-ECs4581-ECs4580) wurden vier Gene detektiert: ECs4587, ECs4586, ECs4585 und ECs4584. Die Gene *escNV* und *z5121* bilden die ersten beiden Mitglieder des Operons (*escNV-z5121-z5118*). Regulatoren dieser Operons sind nicht bekannt.

Die Gene *aceE* (*aceEF-lpdA*), Ecs4333 (ECs4342-ECs4341-ECs4340-ECs4339-ECs4338-ECs4337-ECs4336-ECs4335-ECs4334- ECs4333-ECs4332- ECs4331- ECs4330- ECs4329-ECs4328), ECs4658 (ECs4658-ECs4657), ECs4978 (ECs4981-ECs4980-ECs4979-ECs4978-ECs4977-ECs4976-ECs4975), ECs5259 (ECs5259-ECs5260), *stx2a* (*stx2a-stx2b*), *ubiC* (*ubiAC*), *yfgH* (*yfgHI*), *z4882* (*z4882-z4883*) und schließlich *z5889* (*z5888-z5889*) wurden als einzige Vertreter ihres Operons detektiert. Bei keinem dieser Operons sind Transkriptionsregulatoren bekannt.

Die SlyA-aktivierten Gene *asnA* und *yicP* bilden eigenständige Transkriptionseinheiten, für alle übrigen SlyA-aktivierten Gene (ECS4592 *cesT*, *kup*, *mgIB*, *ndk*, *rhsE*, *tnaA*, *ycbQ*, *ydhS*) existieren keine Nachweise über ihre Transkriptionseinheiten.

Die Gene *flgD* und *flgF* sind im Operon *FlgBCDEF* lokalisiert, das von FlhDC aktiviert wird. ECs1591 (ECs1596-ECs1595-ECs1594-ECs1593-ECs1592-ECs1591), *fliA* (*fliAZ*) und *hflC* (*hflCK*) sind die jeweils ersten Gene eines Operons, *napG* (*napADFGH*), *z1810* (*z1813-z1812-z1811-z1810-z1809-z1808*) und ECs2241 (ECs2243-ECs2242-ECs2241) sind im mittleren Bereich von großen Operons lokalisiert, deren andere Mitglieder nicht als SlyA-abhängig detektiert wurden. Die Regulation dieser Operons ist bislang nicht bekannt. *bssR* und *cutC* stellen alleine je eine Transkriptionseinheit dar. Die Operons von *cof*, *dps*,

ECs1315, ECs2264, *hdhA*, *lpxC*, *lysU*, *yjeA*, *z2309* und *z3242* sind unbekannt. *dps* wird vermutlich von OxyR und IHF aktiviert.

SlyA induziert in EHEC Gene für Membran- und Transportproteine und für Porine, sowie an Sekretionsprozessen beteiligte Gene. Das *mgIB*-Genprodukt ist multifunktionell und an Transport sowie Metabolismus beteiligt, es agiert aber auch als Chaperon. Motilitäts- und Chemotaxisgene werden durch SlyA reprimiert, während Gene für Adhäsion und Fimbriensynthese positiv reguliert sind. In Stoffwechsel- und Regulationsprozesse involvierte Gene sind sowohl positiv als auch negativ SlyA-abhängig. Eine Protease wird durch SlyA reprimiert und eine DNA-Methylase induziert. Außerdem sind mehrere Chaperone und andere Stressgene positiv sowie negativ SlyA-reguliert.

Darüber hinaus induziert SlyA in EHEC mehrere Virulenzfaktoren.

Tab. 3.6: funktionelle Klassen der in EHEC O157:H7 SlyA-regulierten Gene

Funktionelle Klasse		wt vs. $\Delta$ <i>slyA</i>	Regulation [+/-]	wt vs. Überexpression	Regulation [+/-]
1. Zellwand und zelluläre Prozesse	1.1 Membranproteine			<i>ECs0814</i>	+
				<i>ECS4801</i>	+
				<i>yfgH,L</i>	+
				<i>Z0948</i>	+
	1.2 Transport und Porine			<i>mgIB</i>	+
				<i>kup</i>	+
				<i>z4487</i>	+
	1.3 Sekretion /Typ III Sekretion			<i>cesD</i>	+
				<i>escC,D,F,J,N,R,S, T,V</i>	+
				<i>sepD,L,Q,Z</i>	+
	1.4 Motilität und Chemotaxis			<i>flgD,F</i>	-
				<i>fliA</i>	-

Funktionelle Klasse		wt vs. $\Delta slyA$	Regulation [+/-]	wt vs. Überexpression	Regulation [+/-]
1.	1.5 Adhäsion und putative Fimbrien			<i>ECs4665</i>	+
				<i>ECs4666</i>	+
				<i>ycbQ</i>	+
				<i>tir</i>	+
				intimin	+
2. Metabolismus	2.1 Kohlenhydrate			<i>wbdR</i>	+
				<i>lpxC</i>	-
	2.2 Aminosäuren			<i>gcvT</i>	+
				<i>asnA</i>	+
				<i>tnaA</i>	+
				<i>Z5522</i>	+
	2.3 Lipide			<i>hdhA</i>	-
	2.4 Nukleotide			<i>aceE</i>	+
				<i>ndk</i>	+
				<i>yicP</i>	+
				<i>yjeA</i>	-
	2.5 Phosphate			<i>deoC</i>	+
	2.5 Energistoffwechsel			<i>cyoB,C</i>	+
				<i>ubiC</i>	+
				<i>napG</i>	-
3. Informationswege	3.1 Regulation			<i>slyA</i>	+
		<i>gadX</i>	+		
				<i>cro</i>	+
				<i>ler</i>	+
				<i>bssR</i>	-
				<i>hflC</i>	-
	3.2 DNA Restriktion/ Modifikation/ Reparatur			<i>hsdM</i>	+
	3.3 Proteasen			<i>Ecs1591</i>	-

Funktionelle Klasse		wt vs. $\Delta slyA$	Regulation [+/-]	wt vs. Überexpression	Regulation [+/-]
4. Adaptation	4.1 Hitzeschock/ Chaperone			<i>lysU</i>	-
				<i>z3918</i>	+
				<i>cutC</i>	-
	4.2 Andere Stressarten			<i>dps</i>	-
5. Virulenz- Faktoren				<i>clyA</i>	+
				<i>espA,B,D</i>	+
				<i>stx2a</i>	+
6. Unbekannte Funktion		<i>ECS4585</i>	-		
		<i>ECS4586</i>	-		
				<i>yedA</i>	+
				<i>cesT</i>	+
				<i>rhsE</i>	+
				<i>ydhS</i>	+
				<i>yihL</i>	+
				<i>yjbL</i>	+
				<i>ECs0232</i>	+
				<i>ECs0233</i>	+
				<i>ECs0238</i>	+
				<i>ECs1814</i>	+
				<i>ECs1821</i>	+
				<i>ECs2155</i>	+
				<i>ECs2714</i>	+
				<i>ECs4333</i>	+
				<i>ECs4584</i>	+
				<i>ECs4585</i>	+
				<i>ECs4586</i>	+
				<i>ECs4587</i>	+
				<i>ECs4589</i>	+
				<i>ECs4592</i>	+
				<i>ECs4608</i>	+

Ergebnisse

			<i>ECs4656</i>	+
Funktionelle Klasse	wt vs. $\Delta s/yA$	Regulation [+/-]	wt vs. Überexpression	Regulation [+/-]
6. Unbekekannte Funktion			<i>ECs4658</i>	+
			<i>ECs4978</i>	+
			<i>ECs5259</i>	+
			<i>z0266</i>	+
			<i>z0335</i>	+
			<i>z1628</i>	+
			<i>z2077</i>	+
			<i>z2242</i>	+
			<i>z2256</i>	+
			<i>z2338</i>	+
			<i>z4177</i>	+
			<i>z4882</i>	+
			<i>z5102</i>	+
			<i>z5104</i>	+
			<i>z5113</i>	+
			<i>z5114</i>	+
			<i>z5115</i>	+
			<i>z5117</i>	+
			<i>z5121</i>	+
			<i>z5123</i>	+
			<i>z5128</i>	+
			<i>z5129</i>	+
			<i>z5131</i>	+
			<i>z5162</i>	+
			<i>z5163</i>	+
			<i>z5199</i>	+
			<i>z5200</i>	+
			<i>z5489</i>	+
			<i>z5490</i>	+
			<i>z5889</i>	+
			<i>z5924</i>	+

			<i>z5943</i>	+
Funktionelle Klasse	wt vs. <i>ΔslyA</i>	Regulation [+/-]	wt vs. Überexpression	Regulation [+/-]
6. Unbekannte Funktion			<i>z6024</i>	+
			<i>cof</i>	-
			<i>ECs1315</i>	-
			<i>ECs2241</i>	-
			<i>ECs2264</i>	-
			<i>z1810</i>	-
			<i>z2309</i>	-
			<i>z3242</i>	-

+ : positive Regulation durch SlyA

- : negative Regulation durch SlyA

Die regulatorischen Sequenzen von Genen, deren Transkriptionseinheiten bekannt sind, wurden hinsichtlich des Vorkommens von potentiellen SlyA-Bindemotiven untersucht. Dazu wurden sie mit aus der Literatur bekannten und in dieser Arbeit identifizierten SlyA-Bindestellen verglichen. Zu den bekannten Bindestellen identische Basen sind durch Fettschrift markiert.

Stromaufwärts des Gens *rpsJ* wurde mit 5'-**agcaatac**-3' ein Sequenzmotiv gefunden, dass identisch zu einem Teil der in Kapitel 3.4.2 beschriebenen SlyA-Bindestellen II und III des *PslyA<sub>E.coli</sub>* ist. Die Sequenzen 5'-**ttagcaatcc**-3'-stromaufwärts des *sdhC*-Gens und 5'-**attgagcaagca**-3' stromaufwärts von *pdhR* weisen große Ähnlichkeit zu der Sequenz ttagcaagct der SlyA Bindestelle I im *slyA*-Promotor auf. Stromaufwärts von sieben Genen wurden DNA-Motive gefunden, die große Ähnlichkeit zu der SlyA-Consensus-Sequenz im *PslyA<sub>Salmonella</sub>* (ttagcaagctaa) besitzen: *araC* (gcat**agcaaa**gt), *nirB* (aat**gagcaaa**gt), *nmpC* (tat**tagcaac**ga), *rpoE* (gg**tcagcatagc**), *sdhC* (act**tagcaatcc**), *slyB* (ct**taagcaaggc**) und *yicp* (ag**ttagcaa**ata).

Stromaufwärts von 15 Genen wurden Motive identifiziert, die je einer von zwei SlyA-Bindestellen im *PclyA<sub>E.coli</sub>* (ttatcatattaa; atagaaataaag) ähneln (Wyborn *et al.*, 2004b). Zusätzliche Basen, die in der *clyA* Sequenz vorhanden sind, in den identifizierten Motiven jedoch fehlen, sind in Klammern angegeben. *asnA* (acttt**tataaag**; atg**ccgataa**ag), *tdcA* (a**caaaaatcagg**; tgatatt**ttaa**g), *sdaC* (ataaat**gattaa**), *rplA* (ttataaat**ggcta**), *rplK* (tc**agcgataa**ag), *nanA* (ac**aggtataa**g), *flgB* (atagaa**acacga**), *dnaK* (ttat**caccgtac**), *rhsE* (ttat**cacaggca**), *rhsA* (atagaa**agtttg**; ttatcat**ggtga**), *llpD* (ttt**ccaattaa**), *fliA* (ccat**ca**-(ta)-**ttaa**;



**tagtcaaagttaaag**), *evgA* (**ttatcccaggaa**; **ttatctta**-(tt)-**aa**), ECS1596 (**ccagccataaag**) und *bssR* (**ctgtcaataaag**).

Tab. 3.7: potentielle SlyA-Bindemotive in SlyA-abhängigen Genen

	<i>PslyA<sub>Salmonella</sub></i> ttagcaacga	<i>PslyA<sub>E.coli</sub></i> Bindestelle I ttagcaagctaa	<i>PslyA<sub>E.coli</sub></i> Bindestelle II agcaatacaattgct	<i>PslyA<sub>E.coli</sub></i> Bindestelle III agcaataca	<i>PclyA<sub>E. coli</sub></i> Bindestelle I ttatcatattaa	<i>PclyA<sub>E. coli</sub></i> Bindestelle II atagaaataaag
<i>rpsJ</i>			<b>agcaatac<sup>a</sup></b>	<b>agcaatac<sup>a</sup></b>		
<i>sdhC</i>		<b>ttagcaatcc<sup>a</sup></b>				
<i>pdhR</i>		<b>attgagcaagca<sup>a</sup></b>				
<i>araC</i>	gcatagcaaagt <sup>a</sup>					
<i>nirB</i>	aatgagcaaagt <sup>a</sup>					
<i>nmpC</i>	attagcaacga <sup>a</sup>					
<i>rpoE</i>	ggtcagcatagc <sup>a</sup>					
<i>sdhC</i>	acttagcaatcc <sup>a</sup>					
<i>slyB</i>	cttaagcaaggc <sup>a</sup>					
<i>yicP</i>	agttagcaaata <sup>a</sup>					
<i>asnA</i>						<b>actttataaag<sup>a</sup></b> <b>atgccgataaag<sup>a</sup></b>
<i>tdcA</i>						<b>acaaaaatcagg<sup>a</sup></b> , <b>tgatatttaaag<sup>a</sup></b>
<i>sdaC</i>						<b>ataaatgattaa<sup>a</sup></b>
<i>rplA</i>					<b>ttataaatggcta<sup>a</sup></b>	
<i>rplK</i>						<b>tcagcgataaag<sup>a</sup></b>
<i>nanA</i>						<b>acagggtataaag<sup>a</sup></b>
<i>figB</i>						<b>atagaaacacga<sup>a</sup></b>

## Ergebnisse

	<i>PslyA<sub>Salmonella</sub></i> ttagcaacga	<i>PslyA<sub>E.coli</sub></i> Bindestelle I ttagcaagctaa	<i>PslyA<sub>E.coli</sub></i> Bindestelle II agcaatacaattgct	<i>PslyA<sub>E.coli</sub></i> Bindestelle III	<i>PclyA<sub>E. coli</sub></i> Bindestelle I ttatcatattaa	<i>PclyA<sub>E. coli</sub></i> Bindestelle II atagaaataaag
<i>dnaK</i>					<b>ttatcaccgtac<sup>a</sup></b>	
<i>rhsE</i>					<b>ttatcacaggca<sup>a</sup></b>	
<i>rhsA</i>					<b>ttatcatggtga<sup>a</sup></b>	<b>atagaaagtttg<sup>a</sup></b>
<i>llpD</i>					<b>tttccaattaa<sup>a</sup></b>	
<i>fliA</i>					ccatca-(ta)- <b>ttaa<sup>a b</sup></b>	<b>tagtcaaagttaaag<sup>a</sup></b>
<i>evgA</i>					<b>ttatcccaggaa<sup>a</sup>;</b> <b>ttatctta-(tt)-aa<sup>a b</sup></b>	
ECS1596						<b>ccagccataaag<sup>a</sup></b>
<i>bssR</i>						<b>ctgtcaataaag<sup>a</sup></b>

a. Zu den bekannten Bindestellen identische Basen sind durch Fettschrift markiert.

b. Zusätzliche Basen, die in der *clyA* Sequenz vorhanden sind, in den identifizierten Motiven jedoch fehlen, sind in Klammern angegeben

### 3.7 SlyA-Induktion der Säureresistenz in *E. coli*

#### 3.7.1 SlyA induziert die Expression der Säureresistenz-Gene *adiC*, *evgA* und *gadA*

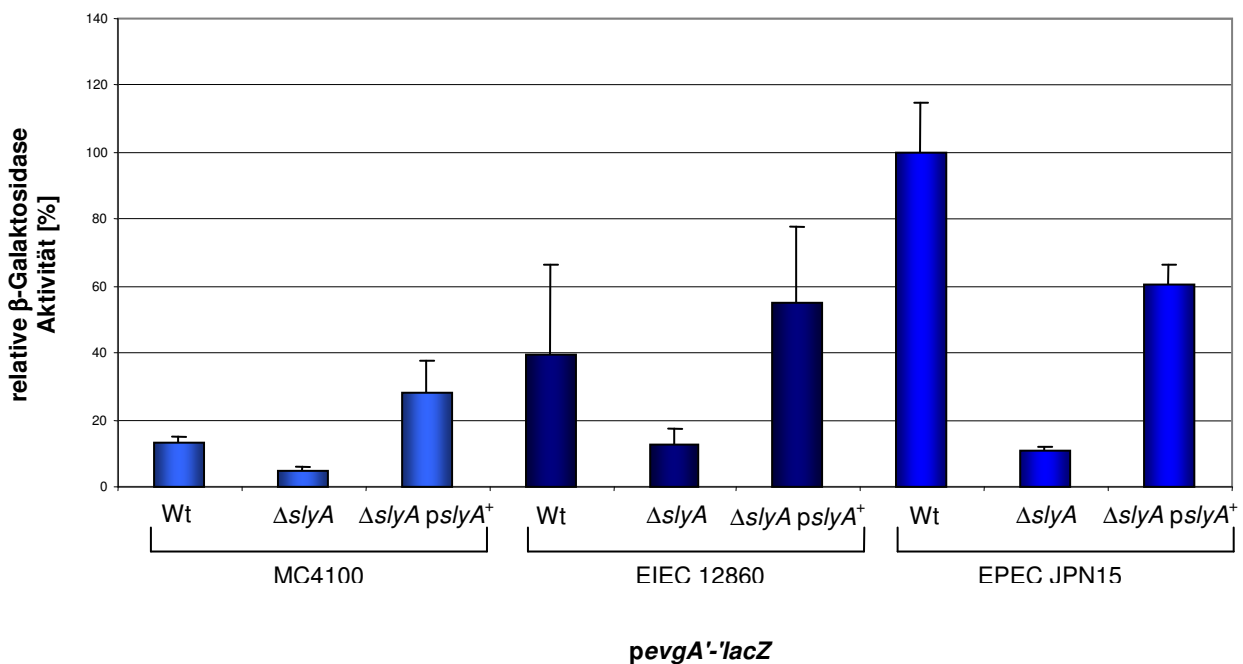
Eine wichtige Funktion scheint SlyA bei der Vermittlung der Säureresistenz zu spielen. So konnten durch die vergleichende Analyse des Expressionsprofils des *E. coli* K-12 und EHEC EDL933 Wildtyps mit der korrespondierenden *slyA*-Mutante mehrere Gene als SlyA-aktiviert identifiziert werden, die Resistenz gegenüber Säurestress vermitteln (siehe vorhergehendes Kapitel). Das *adiC*-Genprodukt ist ein zum Arginin-abhängigen XAR-System gehörender Antiporter, der im *E. coli* K-12 Wildtyp ca. 1,6fach gegenüber der *slyA*-Mutante induziert war. Die Expression des *evgA*-Gens, das den gleichnamigen Regulator des Glutamat-abhängigen XAR-Systems kodiert, war im *E. coli* K-12 Wildtyp ebenfalls ca. 1,6fach induziert. Im EHEC EDL933 Wildtyp war die Expression von *gadX*, eines weiteren Regulators dieses Systems, 1,7fach induziert. Darüber hinaus wurde in *E. coli* K-12 die Expression von drei Säurestress-Genen als SlyA-induziert detektiert, die indirekt von EvgA aktiviert werden: *hdeA* (ca. 2,5fach), *hdeB* (ca. 3fach) und *hdeD* (ca. 1,5fach).

Der Response-Regulator EvgA ist der zentrale Regulator bei der Antwort auf Säurestress. Um zu überprüfen, ob SlyA über EvgA auf die übrigen Säurestressgene wirkt, wurde zunächst eine translationale *evgA*'-'*lacZ*-Fusion im Vektor pGP20 konstruiert, diese in den Wildtyp bzw. die *slyA*-Mutante von MC4100 sowie EPEC und EIEC eingebracht und die Mutation durch Plasmid-kodiertes *slyA*<sub>EIEC</sub> (pAW8) kompensiert. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den verschiedenen Stammhintergründen wurde in bei 37°C gezogenen Übernacht-Kulturen verglichen (Abb. 3.18).

Im apathogenen *E. coli* Stamm MC4100 war die *evgA*-Expression generell sehr niedrig. In den pathogenen Stämmen EIEC 12860 und EPEC JPN15 hingegen war die Expressionsrate 2,9fach bzw. 7,4fach höher als in *E. coli* K-12.

Der Verlust des *slyA*-Gens hatte einen deutlichen Effekt auf die *evgA*-Expression: Die Expression des Fusionskonstruktes war in einer *slyA*-Deletionsmutante von MC4100 und EIEC 12860 signifikant (2,8fach bzw. 3,2fach) reduziert. Die Mutation konnte durch Einbringen eines plasmidkodierten *slyA*-Gens vollständig komplementiert werden.

In EPEC JPN15 war der Effekt noch drastischer: In der *slyA*-Mutante lag die *evgA*'-'*lacZ*-Expression 9,5fach unter der des Wildtyps. Die Mutation konnte in EPEC nicht vollständig komplementiert werden und blieb auch in Anwesenheit von plasmidkodiertem *slyA* 1,7fach unter dem Niveau des Wildtyps. Generell läßt sich feststellen, dass SlyA für die Aktivierung von *evgA* in allen drei Stämmen benötigt wird.



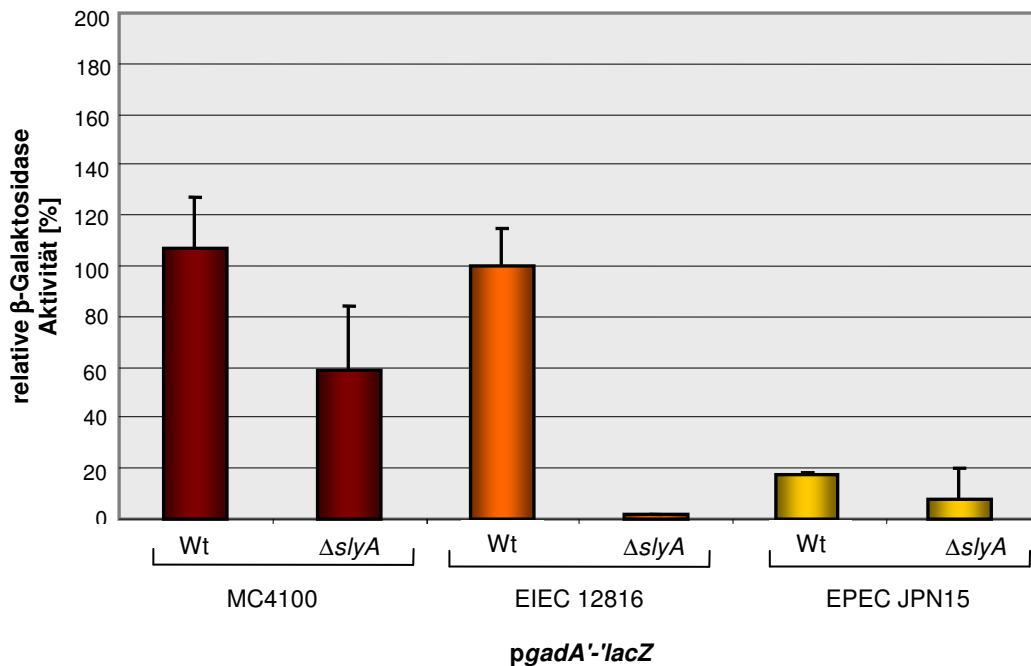
**Abb. 3.18:** Analyse der SlyA-abhängigen *evgA*-Expression in *E. coli*

Das Plasmid pAW34 (*pevgA'-lacZ*) wurde in *E. coli* K-12 MC4100, EIEC 12860 und EPEC JPN15 eingebracht sowie in die jeweiligen *slyA*-Mutanten. Die *slyA*-Defizienz wurde durch Plasmid pAW8 (*slyA*<sub>EIEC</sub><sup>+</sup>) komplementiert. Die so generierten Stämme wurden bei 37°C in LB-Medium über Nacht angezogen und ein β-Galaktosidase-Aktivitäts-Assay durchgeführt. Die spezifische β-Galaktosidase-Aktivität wurde in Dreifachbestimmung gemessen.

Spory *et al.* (2002) konnten bereits mittels 2D-Gelelektrophorese zeigen, dass SlyA in die Regulation der Säurestressgene *hdeA* und *hdeB* von EIEC involviert ist. Darüber hinaus wurde bei diesen Studien die SlyA-Aktivierung des Glutamat-Decarboxylase-Gens *gadA* nachgewiesen. Die Glutamat-Decarboxylase wird für die Produktion von Gamma-Aminobuttersäure (GABA) benötigt, GABA wird vom Antiporter GadC im Austausch gegen Glutamat exportiert. Die Expression des *gadA*-Gens wird über eine Regulationskaskade, die EvgA involviert, induziert. Dennoch wurde das Gen durch die Transkriptomanalyse nicht detektiert. Daher sollte seine SlyA-Abhängigkeit anhand der Expression von *gadA'-lacZ*-Reporter-Gen-Fusionen in verschiedenen *E. coli* Stämmen in An- und Abwesenheit von SlyA nachgewiesen werden. Dazu wurde zunächst eine translationale *gadA'-lacZ*-Fusion im Vektor pGP20 konstruiert. Diese wurde in den Wildtyp bzw. die *slyA*-Mutante von MC4100 sowie EPEC und EIEC eingebracht und die β-Galaktosidase-Aktivität der jeweiligen Übernacht-Kulturen bei 37°C vermessen (Abb. 3.19).

Im *E. coli* K-12 MC4100 Wildtyp wurde die *gadA*-Fusion auf vergleichbarem Niveau zu EIEC 12860 exprimiert, in EPEC JPN15 lag die Expressionsrate 6fach unter der von *E. coli* K-12

und EIEC. In allen drei Stämmen führte die *slyA*-Mutation zu einer Reduktion der *gadA'*-*'lacZ*-Expression: in MC4100 1,8fach, in EPEC 2,1fach und in EIEC sogar 64,5fach. Durch Einbringen des plasmidkodierten *slyA*-Gens aus EIEC (pAW8) konnte die *slyA*-Deletion vollständig komplementiert werden (Daten nicht gezeigt).

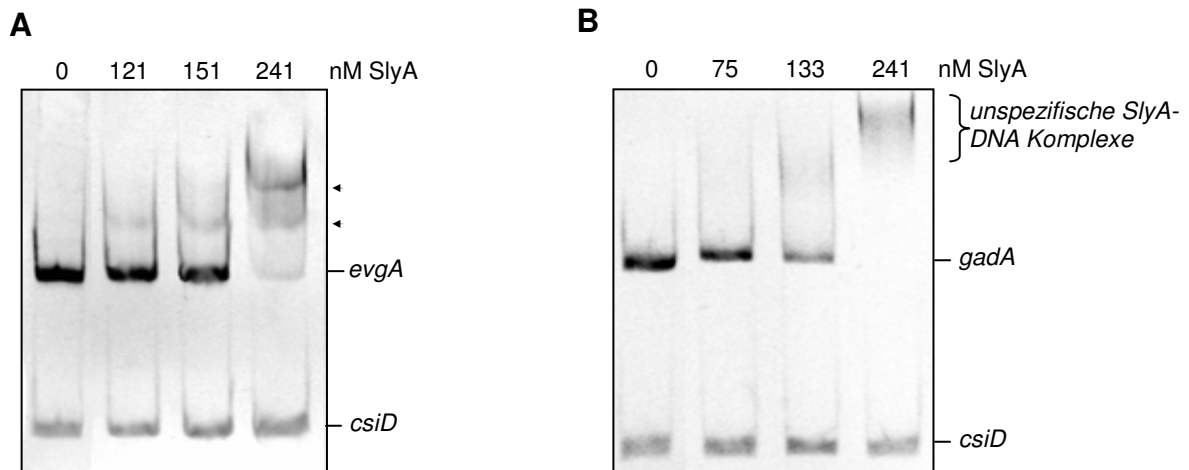


**Abb. 3.19:** Analyse der SlyA-abhängigen *gadA*-Expression in *E. coli*

Das Plasmid pAW31 (*pgadA'*-*'lacZ*) wurde in die Stämme *E. coli* K-12 MC4100, EIEC 1286 und EPEC JPN15 sowie in deren *slyA*-Mutanten transformiert. Die resultierenden Stämme wurden bei 37 °C in LB-Medium über Nacht angezogen und die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Dreifachbestimmung gemessen.

### 3.7.2 Detektion von SlyA-Bindestellen in der *evgA*-Promotorregion durch Gelretardationsexperimente

Um zu überprüfen, ob SlyA direkt an den Promotor von *evgA* bzw. *gadA* binden kann, um deren Expression zu aktivieren, sollten Gelretardationsexperimente mit gereinigtem SlyA-Protein und DNA-Fragmenten der *evgA*- bzw. *gadA*-Promotorregion durchgeführt werden. Dazu wurde in Gel-Retardations-Analysen die direkte Bindung von SlyA an die Regionen von -527 bis +85 des *evgA*-Promotors und -478 bis +22 des *gadA*-Promotors, jeweils relativ zum Startkodon, untersucht. Es wurden etwa 500 bis 600 bp lange DNA-Fragmente eingesetzt. Um die Spezifität der SlyA-Bindung an das jeweilige Fragment sicherzustellen, wurde dem Reaktionsansatz zusätzlich ein DNA-Fragment (*csiD*) als unspezifischer Kompetitor zugesetzt. Promotorfragment und Kompetitor wurden ohne bzw. mit aufsteigender SlyA-Menge inkubiert und entstandene Protein-DNA-Komplexe anschließend in einem 4%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Es konnte gezeigt werden, dass das SlyA-Protein direkt und spezifisch mit Sequenzen stromaufwärts des *evgA*-Promotors interagiert (Abb. 3.20 A). Die Detektion der beiden distinkten DNA-Proteinkomplexe indiziert dabei das Vorhandensein von zwei SlyA-Bindestellen unterschiedlicher Affinität innerhalb der untersuchten Region. Dagegen bildeten sich bei der Untersuchung des Promotorbereichs des *gadA*-Gens keine distinkten SlyA-DNA-Banden aus (Abb. 3.20 B).

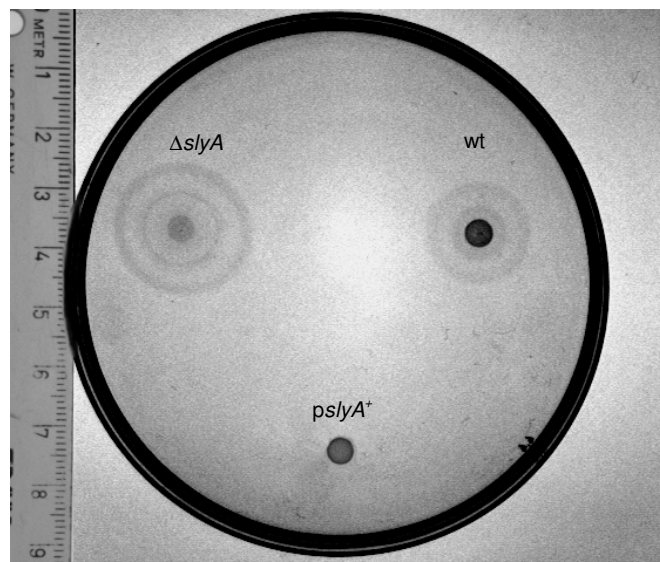


**Abb. 3.20:** Gelretardation des *evgA*- und *gadA*-Promotors durch Bindung von SlyA

Anhand von *in vitro* Gelretardations-Analysen wurde die Bindung von gereinigtem SlyA-Protein an PCR-generierte *evgA*- (A) und *gadA*-Promotorfragmente (B) von ca. 500 und 600 bp Größe untersucht. Als Kompetitor wurde ein ca. 250 bp großes Promotor-Fragment des *csiD*-Gens eingesetzt. Die DNA-Fragmente wurden ohne bzw. mit aufsteigenden Mengen SlyA-Protein inkubiert. Die Auftrennung der SlyA-DNA-Komplexe erfolgte über 4 %ige PAGE-Gele. Pfeilspitzen markieren die retardierten SlyA-DNA-Komplexe.

### 3.8 Der Einfluss von SlyA auf Motilität und Morphologie von *E. coli*

Bei der DNA-Chip-Analyse (siehe Kapitel 3.6.1.2) wurden mehrere Motilitätsgene in EHEC EDL933 detektiert, die durch die Überexpression von SlyA deutlich reprimiert wurden (*fliA*, *flgD*, *flgF*). Darunter war auch *fliA*, das den alternativen  $\sigma$ -Faktor  $\sigma^{28}$  kodiert. FliA spielt als Aktivator eine entscheidende Rolle bei der Induktion des Flagellen-Regulons. Diese Entdeckung führte zu der Vermutung, dass SlyA über die Regulation des  $\sigma$ -Faktors FliA die Motilität von EHEC beeinflusst. Um die Motilität von EHEC EDL933 in Abhängigkeit von SlyA zu evaluieren, wurde das Schwärmverhalten von Wildtyp, *slyA*-Mutante und *slyA*-überexprimierendem Stamm anhand von Trypton-Weichagar-Platten untersucht (Abb 3.21). Dazu wurden jeweils 2  $\mu$ l einer Bakteriensuspension jedes Stammes auf Trypton-Schwärmagar inokuliert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Die *slyA*-Mutante war auf den Weichagar-Platten gegenüber dem Wildtyp hypermotil und bildete konzentrische Schwärmringe mit signifikant vergrößertem Durchmesser um den Punkt der Inokulation. Durch Einbringen eines auf dem Midi-copy Vektor pBAD33 klonierten *slyA*-Gens (pAW8) in den Wildtyp konnte die EHEC-Motilität vollständig unterdrückt werden. Der Motilitätsverlust des Überexpressionsstammes könnte entweder auf die Abwesenheit von Flagellen oder auf die Unfähigkeit, diese zu benutzen, zurückzuführen sein.

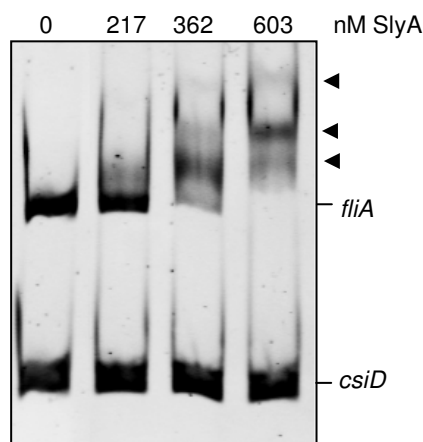


**Abb. 3.21:** Schwarm-Phänotypen von EHEC EDL933 wt, *slyA*<sup>-</sup> und *pslyA*<sup>+</sup>

2  $\mu$ l einer Übernachtskultur von EHEC EDL933 Wildtyp, korrespondierender *slyA*-Mutante und *slyA*-überexprimierendem Derivat wurden auf Trypton-Weichagar-Platten inokuliert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Der Radius der Schwärm-Höfe gibt Aufschluss über die Motilität des untersuchten Stammes.



Um zu überprüfen, ob SlyA direkt an den *fliA*-Promotor bindet, wurden Gel-Retardations-Analysen durchgeführt. Es wurde die Region von -497 bis + 12 des *fliA*-Promotors untersucht unter Einsatz eines 510 bp langen Promotorfragements und eines 245 bp langen Kontrollfragmentes. Die verwendeten Primer sind in der Tab. 2.11 aufgelistet, ihre Sequenzen in der Tab. 2.10. Promotorfragment und Kontrollfragment wurden mit aufsteigender SlyA-Menge inkubiert und entstandene Protein-DNA-Komplexe anschließend in einem 4%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Aus Abb. 3.22 ist ersichtlich, dass das SlyA-Protein direkt und spezifisch mit Sequenzen stromaufwärts des *fliA*-Promotors interagiert. Die Detektion von mehreren distinkten Shifts indiziert dabei das Vorhandensein von mehreren SlyA-Bindestellen unterschiedlicher Affinität innerhalb der untersuchten Region.



**Abb. 3.22:** Gelretardation des *fliA*-Promotors durch Bindung von SlyA

Anhand von in vitro Gelretardations-Analysen wurde die Bindung von gereinigtem SlyA-Protein an ein PCR-generiertes *fliA*-Promotorfragmente von ca. 500 bp Größe untersucht. Als Kompetitor wurde ein ca. 250 bp großes Promotor-Fragment des *csiD*-Gens eingesetzt. Die DNA-Fragmente wurden ohne bzw. mit aufsteigenden SlyA-Mengen inkubiert. Die Auftrennung der SlyA-DNA-Komplexe erfolgte mittels eines 4 %igen PAGE-Gels. Pfeilspitzen markieren die retardierten SlyA-DNA-Komplexe.

In *E. coli* K-12 wurden mittels Transkriptom-Analyse keine Motilitätsgene als SlyA-abhängig detektiert. Der verwendete Stamm MC4100 ist aufgrund einer Frameshift-Mutation im *flhDC*-Operon, das den flagellaren Hauptregulator FlhDC kodiert, amotil (Casadaban, 1976; Barembruch & Hengge, 2007) und zeigte unter den getesteten Bedingungen SlyA-unabhängig kein Schwärmverhalten (Daten nicht gezeigt).

EIEC 12860 und EPEC JPN15 waren unter den getesteten Bedingungen ebenfalls sowohl in An- als auch in Abwesenheit von SlyA amotil (Daten nicht gezeigt).

Von EIEC ist bekannt, dass die Stämme mit Ausnahme des Serotyps O124:H30 unter normalen Bedingungen gewöhnlich nicht motil sind und keine Flagellen ausbilden. In mehreren Stämmen verschiedener Serotypen konnte jedoch die Produktion von einem bis zu fünf Flagellenfilamenten nachgewiesen werden (Andrade *et al.*, 2002). Der Nutzen der Flagellen-Expression für diese Stämme ist zurzeit unklar. EPEC Stämme sind unter

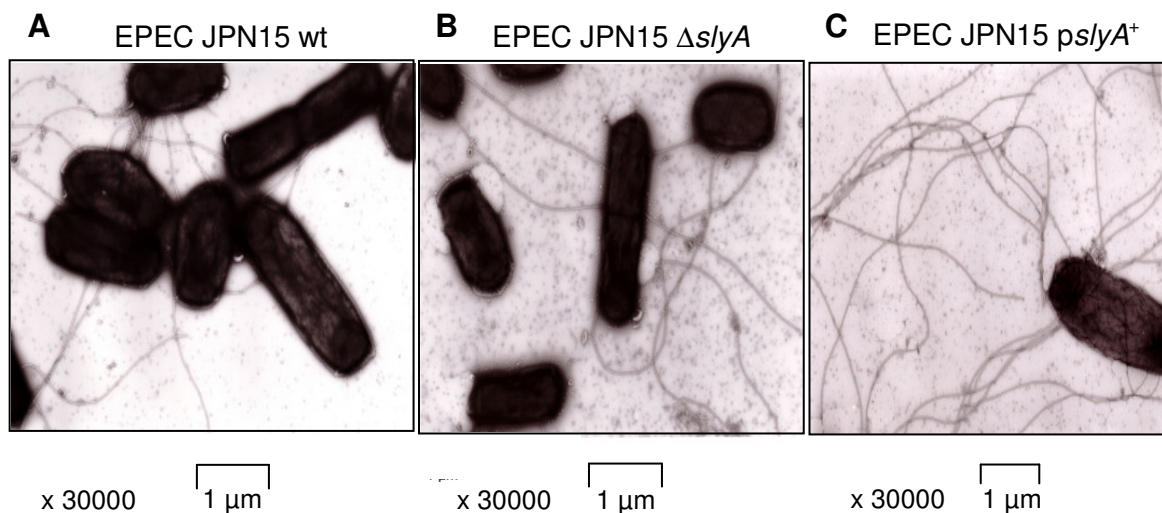
Bedingungen, bei denen der LEE Locus optimal exprimiert wird, ebenfalls nicht flagelliert und nicht motil.

Da sowohl EIEC 12860 als auch EPEC JPN15 auf den Weichagarplatten keine Motilität zeigten, sollte die Synthese von Flagellen beider Stämme im Hinblick auf den SlyA-Einfluss durch negativ-Färbung Elektronenmikroskopie analysiert werden. Bei beiden Stämmen wurde auf diesem Weg ein signifikanter, wenn auch unterschiedlicher Einfluss von SlyA auf die Flagellen-Synthese beobachtet.

EPEC JPN15 wt Zellen exprimierten generell mehr Flagellen als EIEC 12860. Die *slyA*-Mutation bewirkte in EPEC keinen nennenswerten Effekt (Abb. 3.23 B). Die Überexpression von plasmidkodiertem *slyA* führte jedoch zur Bildung von untypischen, extrem verlängerten Flagellen (Abb. 3.23 C).

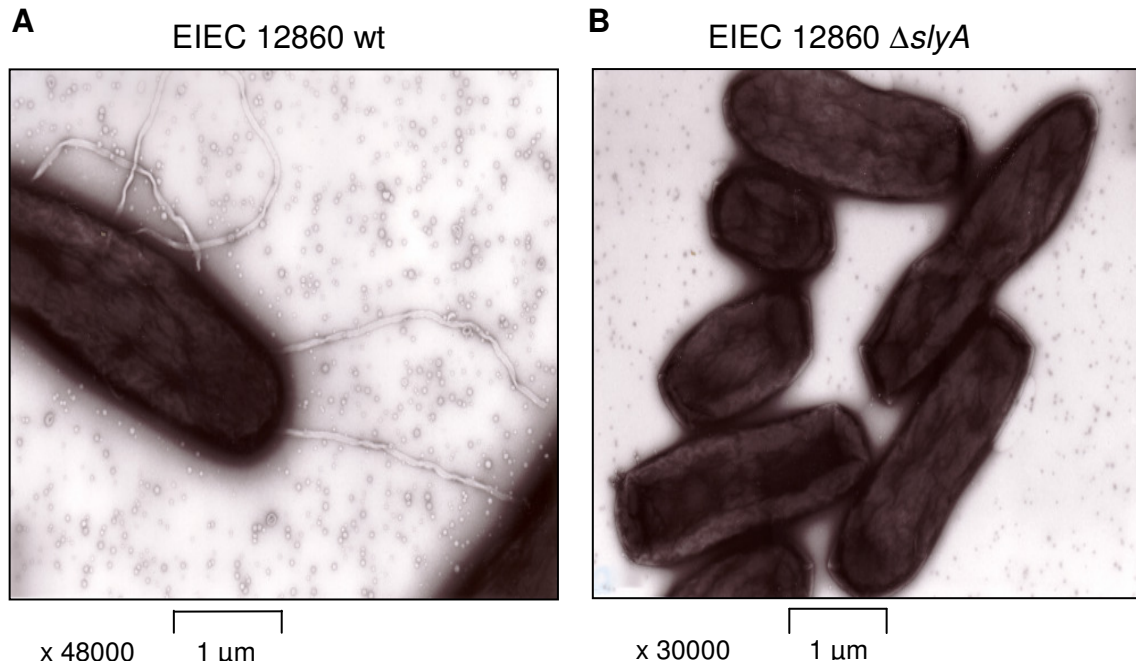
Die EIEC 12860 wt Zellen exprimierten mehrheitlich ca. 5 Flagellen auf der Oberfläche (Abb. 3.24 A). Zellen, die eine *slyA*-Mutation trugen, exprimierten dagegen überwiegend überhaupt keine Flagellen (Abb. 3.24 B). Bei beiden Stämmen scheint SlyA somit die Anzahl der Flagellen zu beeinflussen.

Darüber hinaus war die Morphologie der EIEC-Zellen durch den Verlust von *slyA* verändert. Die *slyA*-deletierten Derivate fielen durch die Bildung kleinerer und eher sphärischer Zellen auf, während der Wildtyp *E. coli*-typische Stäbchenzellen formte (Abb. 3.25).



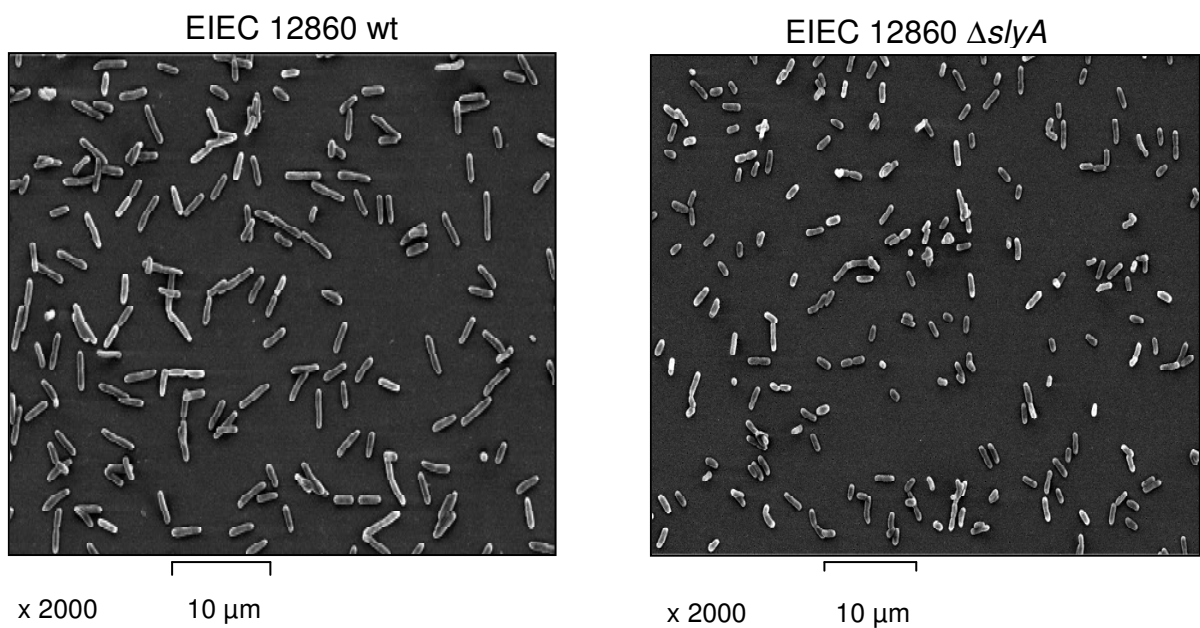
**Abb. 3.23:** Die Überexpression von *slyA* in EPEC JPN15 bewirkt die Synthese extrem langer und vieler Flagellen

Zellen von EPEC JPN15 wt *slyA*<sup>+</sup>, und *slyA*<sup>+</sup> Mutantenstämmen wurden bei 30°C in LB Medium über Nacht kultiviert und im Transmissions-Elektronenmikroskop untersucht.



**Abb. 3.24:** Eine *slyA*-Mutante von EIEC 12860 exprimiert keine Flagellen

Zellen von EIEC 12860 wt und *slyA*<sup>-</sup> Kulturen wurden über Nacht bei 30°C in LB Medium kultiviert und durch Raster-Elektronenmikroskopie betrachtet.



**Abb. 3.25:** Der Effekt einer *slyA*-Mutation auf die Zellmorphologie von EIEC 12860

Zellen von EIEC 12860 wt und *slyA*<sup>-</sup> Kulturen wurden bei 30°C in LB Medium über Nacht kultiviert und im Rasterelektronenmikroskop betrachtet.

## 4. Diskussion

### 4.1 Analyse der SlyA-Synthese in pathogenen und apathogenen Virotypen von *E. coli*

Das SlyA-Protein gehört zur Familie der MarR-ähnlichen transkriptionellen Regulatoren. Diese beinhaltet auch die zu SlyA homologen Proteine SlyA von *Salmonella*, RovA von *Yersinia*, Rap von *Serratia* und Hor von *Pectobacterium carotovorum*. Mitglieder dieser Familie kontrollieren in Reaktion auf Umweltsignale die Expression von Stoffwechsel- und Stressgenen sowie Virulenzgenen und ermöglichen so die Anpassung der Pathogene an sich ändernde Bedingungen im Verlauf des Infektionsprozesses. SlyA ist ebenfalls in die Kontrolle der Virulenz von *E. coli* involviert, so induziert es beispielsweise die Gene der K5 Kapsel-Synthese in uropathogenen *E. coli* (Corbett *et al.*, 2007).

Zudem kontrolliert SlyA das *clyA*-Gen für das Cytolysin A aus *E. coli* (Ludwig *et al.*, 1999; Lithgow *et al.*, 2007), der Prototyp einer neuen Familie von porenbildenden Zytolysinen in *Enterobacteriaceae* (von Rhein *et al.*, 2009). Das *clyA*-Gen kodiert ein porenbildendes cytotoxisches 34 kDa großes Protein (del Castillo *et al.*, 1997; Green & Baldwin, 1997; Ludwig *et al.*, 1999; Oscarsson *et al.*, 1999; Wallace *et al.*, 2000). ClyA aus *Salmonella* sowie aus *E. coli* verursacht die Bildung von Poren in der Erythrozytenmembran mit einem effektiven Durchmesser von etwa 3-3,5 nm (Ludwig *et al.*, 1995;1999; Oscarsson *et al.*, 1999; Wallace *et al.*, 2000; Eifler *et al.*, 2006; Tzokov *et al.*, 2006; von Rhein *et al.*, 2008), die in *E. coli* hauptsächlich oktamerisch sind (Tzokov *et al.*, 2006) und in den betroffenen Zellen Apoptose auslösen (Lai *et al.*, 2000). Wie andere porenbildende Cytolysine könnte ClyA durch die Tötung von Immunzellen und die Erzeugung von Gewebeschäden zur Pathogenität von Mikroorganismen beitragen. Die SlyA-vermittelte Kontrolle der Expression dieses Gens erfolgt auf Transkriptions-Ebene. Unter Standard-Laborbedingungen ist der *clyA*-Lokus in *Salmonella* und *E. coli* kryptisch, d.h. er wird nicht exprimiert (Oscarsson *et al.*, 2002; Ludwig *et al.*, 2008). In *E. coli* wird er unter diesen Bedingungen durch H-NS reprimiert (Westermarck *et al.*, 2000), kann aber durch die Überexpression von SlyA induziert werden (Oscarsson *et al.*, 1996; Westermarck *et al.*, 2000; von Rhein *et al.*, 2009). Wenn SlyA in höheren Konzentrationen vorliegt, inhibiert es die H-NS-Bindung durch Konkurrenz um die Bindestelle am *clyA*-Promotor und ermöglicht so der RNA-Polymerase den Zugang (Wyborn *et al.*, 2004b; Lithgow *et al.*, 2007). In einem *hns*<sup>-</sup> Stamm wird für die *clyA*-Expression kein Aktivatorprotein benötigt.

Bisherige Kenntnisse stammen aus Studien in *E. coli* K-12, in denen für die Derepression des *clyA*-Gens eine Überexpression von SlyA notwendig war. Im Jahr 2008 erschien eine Studie über funktional homologe Gene in *Salmonella enterica* serovar Typhi und Paratyphi A

von C. von Rhein *et al.* Unter normalen Wachstumsbedingungen produzierten diese Stämme ähnlich *E. coli* K-12 nur geringe Mengen des ClyA-Proteins und zeigten keinen *clyA*-abhängigen hämolytischen Phänotyp, doch auch hier konnte durch SlyA-Überproduktion die *clyA*-Expression induziert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass der *clyA*-Lokus in den getesteten pathogenen *E. coli* Stämmen EIEC 12860 und EPEC JPN15 nicht kryptisch ist. Eine vergleichende Analyse der Expression von *clyA*-Reporterfusionen in *E. coli* K-12 mit klinischen *E. coli* Isolaten sowie von deren Fähigkeit, Hämolysehöfe auf Enterohämolysin-Blutagar-Platten auszubilden verdeutlichte, dass die *clyA*-Synthese generell in den pathogenen *E. coli* Stämmen höher als im apathogenen *E. coli* K-12 ist. Durch Mutation und Überexpression des *slyA*<sub>K12</sub>-Gens konnte die *clyA*-Expression jedoch auch in *E. coli* K-12 weiter gesenkt respektive gesteigert werden. SlyA aus *E. coli* K-12 scheint demnach funktionell zu sein.

Beim immunologischen Nachweis zeigte sich interessanterweise, dass differentielle SlyA-Mengen in apathogenen und pathogenen *E. coli* Stämmen synthetisiert werden. Die größte SlyA-Menge konnte in EIEC 12860 detektiert werden, gefolgt von EHEC EDL933 und EPEC JPN15. Die SlyA-Menge war generell in der stationären Phase größer als in der exponentiellen.

Für RovA aus *Yersinia* konnte eine temperaturabhängige Regulation gezeigt werden (Heroven *et al.*, 2004; Lawrenz & Miller, 2007): Das *rovA*-Gen wird bei moderaten Temperaturen (20 – 25°C) in *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* von zwei Promotoren und in *Y. enterocolitica* von drei Promotoren transkribiert, bei 37°C wird es jedoch nicht exprimiert (Heroven *et al.*, 2004; Lawrenz & Miller, 2007). Darüber hinaus ist RovA einem Temperatur- und Wachstumsphasenabhängigen Abbau durch die Proteasen Lon und ClpP unterworfen (Herbst *et al.*, 2009). Bei exponentiellem Wachstum bei 37°C wird RovA schnell in erster Linie durch die Lon-Protease abgebaut, während die ClpP-Protease nur geringfügig zum Abbau beiträgt. In der stationären Phase und bei moderaten Temperaturen (20 - 25°C) ist RovA dagegen stabil (Herbst *et al.*, 2009). Lon und ClpP degradieren normalerweise fehlgefaltete oder beschädigte Proteine, doch auch kurzlebige regulatorische Faktoren können ihnen als Substrate dienen (Gottesman, 2003). Beide gehören zu den ATPasen der AAA<sup>+</sup> Überfamilie. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass globulären Proteinen der Zugang zur proteolytischen Kammer verwehrt wird, um unkontrollierten Protein-Abbau zu verhindern. Ein weiteres Merkmal ist ihre ATP-Abhängigkeit, da der Vorgang der Entfaltung und Translokation des Substrates in die proteolytische Kammer unter Hydrolyse von ATP abläuft.

In dieser Studie wurde auch die Stabilität des SlyA-Proteins in Abhängigkeit von der Temperatur, dem Stammhintergrund und der Funktionalität der ATP-abhängigen Proteasen

Lon und ClpP untersucht. In EIEC 12860 blieb das SlyA-Protein in der exponentiellen Phase bei 37°C stabil und wurde bei 25°C nur langsam und unvollständig abgebaut.

In *E. coli* K-12 war kein Abbau des SlyA-Proteins zu verzeichnen. Weder die Deletion der ClpP- noch die der Lon-Protease wirkte sich auf die SlyA-Menge aus. Darüber hinaus wird SlyA in *E. coli* im Gegensatz zu *rovA* in *Yersinia* nicht bei 25°C, sondern 37°C maximal exprimiert. Das bedeutet, dass die Stabilität bzw. Regulation der Stabilität von SlyA in *E. coli* sich deutlich von der von *RovA* in *Y. pseudotuberculosis* unterscheidet.

Vergleichbar mit *RovA* zeigt aber auch der SlyA-Spiegel ein Maximum in der stationären Phase. Dieser Wachstumsphasen-Effekt ist sowohl in apathogenen *E. coli* K-12 als auch in allen getesteten pathogenen Stämmen zu finden und wird wahrscheinlich durch einen gemeinsamen übergeordneten Regulationsmechanismus hervorgerufen. Eine transkriptionelle Regulation der SlyA-Menge ähnlich *RovA* schien demnach naheliegend.

Weiterführende Studien mit *slyA*-Reporterfusionen offenbarten, dass für die unterschiedlichen SlyA-Level in den pathogenen und apathogenen Stämmen Unterschiede im Expressionslevel des *slyA*-Gens verantwortlich sind. Zwei Effekte wirken sich auf die *slyA*-Transkription aus: Zum einen wurde beim Vergleich von *slyA-lacZ*-Fusionen von *E. coli* K-12 und den pathogenen Stämmen EPEC JPN15 und EIEC 12860 in *E. coli* K-12 das *slyA*-Gen aus *E. coli* K-12 schwächer exprimiert als die Fusionen der pathogenen Stämme. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der *slyA*<sub>K-12</sub>-Promotor weniger zugänglich für einen Aktivator ist als der *slyA*-Promotor der pathogenen Stämme. Ein Vergleich der DNA-Sequenzen der regulatorischen Region von *slyA* ergab einen Austausch von A zu G an Position -264 und von T zu G an Position -239 relativ zum Transkriptionsstart zwischen *E. coli* K-12 (MC4100 und CC118 $\lambda$ pir) und den pathogenen Stämmen EPEC JPN15 und EIEC 12860. Diese Austausche liegen innerhalb der kodierenden Region eines putativen inneren Membranproteins namens YdhI. Das Gen *ydhl* ist Teil des *ydhlJK*-Operons, welches entgegengesetzt zu *slyA* orientiert ist und drei innere Membranproteine kodiert. Der Austausch von A zu G (Position -264) führt zu einer Substitution von Leucin durch Phenylalanin, während der Austausch von T zu G (Position -239) still bleibt. Zusätzlich beinhaltet die EPEC JPN15 *slyA*-Sequenz drei weitere Mutationen, von denen zwei ebenfalls im *ydhl*-Gen lokalisiert sind und Aminosäure-Substitutionen verursachen (G zu A (Alanin zu Serin) an Position -302 und C zu T (Valin zu Tyrosin) an Position -270).



**Abb. 4.1:** Schematische Darstellung der regulatorischen Region von *slyA*

Der Transkriptionsstartpunkt des *slyA*-Gens ist mit der postulierten -35 - und -10 - Region abgebildet. Die -35 - und -10 - Region sind unterstrichen, der Transkriptionsstartpunkt durch einen Pfeil markiert. Die Startcodons des YdhI- und YdhJ-Proteins sind grün hervorgehoben und durch Fettschrift markiert. Basenaustausche gegenüber den pathogenen Stämmen sind rot angezeigt und durch Fettschrift gekennzeichnet.

Mit Ausnahme der Substitution von C nach A in der regulatorischen Region von *slyA*<sub>EPEC</sub> an Position -132, die innerhalb der Bindestelle IV liegt (siehe Abb. 4.2), sind die Austausche außerhalb der postulierten SlyA-Bindestellen lokalisiert. Gelretardations-Analysen, die mit dem SlyA-Protein an den verschiedenen regulatorischen *slyA*-Sequenzen durchgeführt wurden, ergaben dementsprechend keine Unterschiede in der Bindung des Proteins (H. Langhans, unveröffentlichte Daten). Somit könnten andere Proteine aus *E. coli* als SlyA selbst bei der unterschiedlichen Expression von *slyA'*-*lacZ* eine Rolle spielen.

Zum anderen wurden alle untersuchten *slyA*-Fusionen in einem pathogenen Stammhintergrund deutlich höher als in *E. coli* K-12 exprimiert. Dies bedeutet, dass in den pathogenen Stämmen ein Faktor die Expression induziert, oder aber in *E. coli* K-12 ein Faktor die Expression reprimiert, der in den pathogenen Stämmen inaktiv ist bzw. fehlt.

## 4.2 Die Regulation von *slyA*

### 4.2.1 Autoregulation

Ein Regulator von *slyA* ist das SlyA-Protein selbst. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine *slyA*-Mutation in allen getesteten *E. coli* Stämmen zu einer Repression der *slyA*-Expression führt, d. h. dass *slyA* positiv autoreguliert ist.

In *Salmonella* bindet SlyA innerhalb der *slyA*-Promotorregion überlappend mit den –35 und –10 Regionen, wodurch die Bildung des „open complex“ der RNA-Polymerase behindert wird (Stapleton *et al.*, 2002). Somit wird SlyA in *Salmonella* durch den Mechanismus der „promotor occlusion“ negativ autoreguliert.

In dieser Arbeit konnte dagegen mit Hilfe von Regulationsstudien mit *slyA'*-*lacZ*-Fusionen demonstriert werden, dass der *slyA*-Lokus in den pathogenen *E. coli* Stämmen EIEC 12860 und EPEC JPN15 positiv autoreguliert ist. *slyA*-Reportergenfusionen wurden in *slyA*-Mutanten dieser Stämme signifikant schwächer exprimiert als im entsprechenden Wildtyp. Auch in *E. coli* K-12 wurde durch Deletion von *slyA* die ohnehin schon niedrige *slyA'*-*lacZ*-Expression weiter gesenkt.

Um die Autoregulation weiter zu erforschen, wurde zunächst der *slyA*-Promotor von *E. coli* untersucht und der *slyA*-Transkriptionsstartpunkt in *E. coli* K-12 und EIEC 12860 durch Primer-Extension Experimente detektiert. Bei beiden Stämmen wurde ein dominanter Transkriptions-Initiationspunkt 48 Nukleotide stromaufwärts des Startcodons TTG bei einer Thymin-Base identifiziert. Der mRNA-Gehalt an *slyA*-Transkript lag in EIEC 12860 wesentlich höher als in *E. coli* K-12 MC4100. Dieser Befund stützt die Hypothese, dass die in den pathogenen *E. coli* Stämmen vorliegende höhere SlyA-Menge durch eine stärkere Aktivität des *slyA*-Promotors verursacht wird. 14 Nukleotide stromaufwärts des Transkriptionsstarts wurde eine potentielle –10 Region (TACAAT) und bei Position -31 eine potentielle –35 Region (TGCAGCA) detektiert.

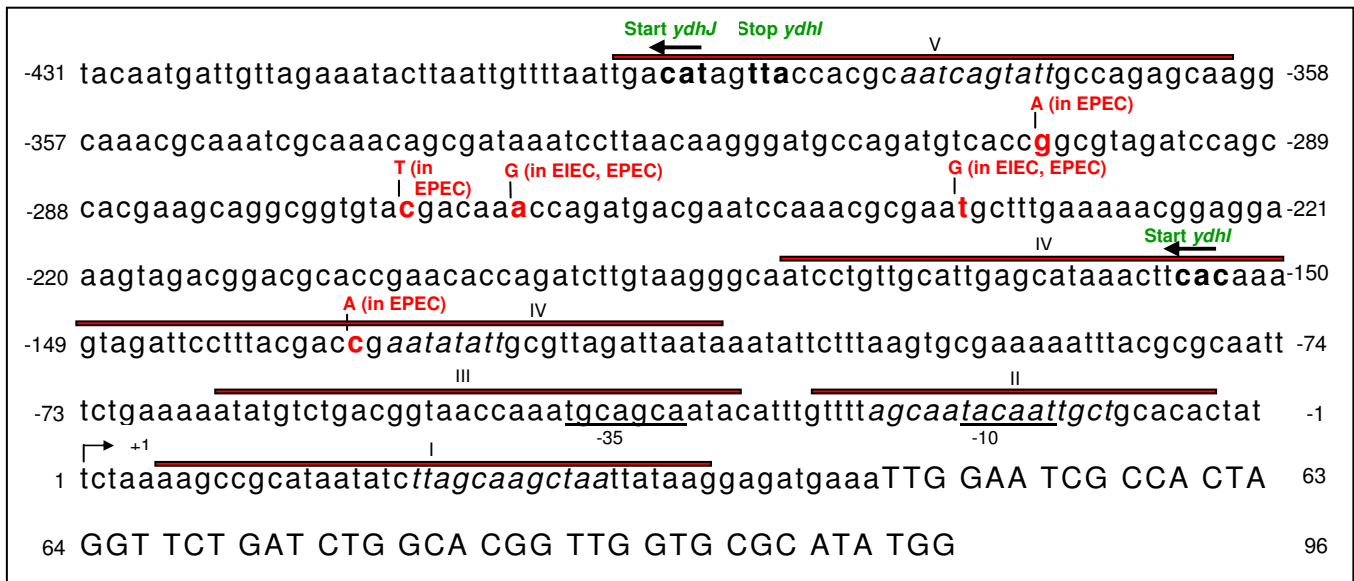
Die Regulation des *slyA*-Gens in *Salmonella* ist bereits näher untersucht worden (Stapleton *et al.*, 2002). Die *slyA*-Transkription beginnt dort 41 Basen "upstream" vom Translationsstart. Drei Basen vorher liegt eine potentielle -10 Region (TATTCT), die durch 17 Basen von einer potentiellen -38 Region (TGCAGCA) getrennt wird (Stapleton *et al.*, 2002; Norte *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2004).

Um den *slyA*-Promotor weiter zu charakterisieren und den Einfluss des *ydhIJK*-Operons auf die *slyA*-Transkription zu bestimmen, wurde eine Serie von *slyA'*-*lacZ*-Konstrukten mit unterschiedlich langen *slyA*-Promotorsequenzen generiert und die Expression dieser Konstrukte in An- und Abwesenheit von SlyA verglichen. Eine fortschreitende Deletion der Promotorregion führte zu einem leichten doch kontinuierlichen Anstieg der Promotoraktivität



im Wildtyp und zu einer deutlichen Expression in der *slyA*-Mutante. Somit scheint das *ydhIJK*-Operon einen negativen Effekt auf die *slyA*-Expression auszuüben. Die maximale Expression wurde durch die Deletion bis zu Position -65 relativ zum Transkriptionsstart erreicht. Die Deletionskonstrukte, die ein Segment bis zur Position -149 enthielten und bei denen die *ydhIJK*-Sequenz somit komplett abgeschnitten war, sind SlyA-unabhängig, denn die *slyA*'-'*lacZ*-Expression war in Mutante und Wildtyp gleich. Dies bedeutet, dass die positive Autoregulation vor allem über die stromaufwärts gelegenen Bindestellen innerhalb der *ydhIJK*-Region vermittelt wird.

Bindestudien mit dem gereinigten SlyA-Protein zeigten, dass SlyA in *E. coli* K-12 und EIEC direkt und spezifisch mit der eigenen Promotorregion interagiert. Vier Bindestellen wurden durch Gelretardationsexperimente identifiziert und ihre Lokalisation durch DNaseI Footprint-Analysen detailliert. Eine SlyA-Bindestelle wurde relativ weit stromaufwärts des Transkriptionsstarts, zwischen Position -361 und -399 (im Folgenden als Bindestelle V bezeichnet) ermittelt, eine zweite liegt im Bereich zwischen -178 und -107 (Bindestelle IV). Eng benachbart zueinander erstrecken sich zwei Bindestellen von Position -63 bis zu -33 (Bindestelle III) sowie von Position -26 bis zu -2 (Bindestelle II), so dass sie an den Transkriptionsstart angrenzt. Die fünfte Bindestelle ist stromabwärts des Startpunktes im Bereich von +8 bis +41 lokalisiert (Bindestelle I). Die nähere Inspektion der geschützten Sequenzen zeigte, dass die Bindestelle I ein nahezu perfektes Palindrom enthält, das aus zwei Hexameren besteht: TTAGCAAGCTAA. Ein Tetramer bestehend aus den Nukleotiden AGCA findet sich außer in dieser palindromischen Sequenz auch innerhalb der geschützten Bereiche II, III und IV und scheint das Kernsequenzmotiv der SlyA-Bindung darzustellen. Bindestelle II enthält ebenfalls ein nahezu perfektes Palindrom AGCAATACAATTGCT, was darauf hindeutet, dass SlyA als Dimer an diese Sequenzen bindet. Die Nähe der SlyA-Bindestellen zueinander wie auch die diffus erscheinenden DNA-Protein Komplexe in den Gelretardationsexperimenten deuten darüber hinaus auf eine kooperative Bindung von mehreren SlyA-Molekülen hin.



**Abb. 4.2:** Schematische Darstellung der mittels DNaseI Protektionsversuche identifizierten SlyA-Bindestellen im  $P_{slyA}$

Der Transkriptionsstartpunkt des *slyA*-Gens ist mit der postulierten –35 - und –10 - Region sowie den Bindestellen des SlyA-Proteins abgebildet. Palindromartige Sequenzen sind kursiv gedruckt. Die –35 - und –10 - Region sind unterstrichen, der Transkriptionsstartpunkt durch einen Pfeil markiert und die SlyA-Bindestellen durch rote Balken über der Sequenz hervorgehoben.

In *Salmonella* wurden insgesamt fünf Bindestellen in der Promoterregion des *slyA*-Gens mittels DNA-Footprintanalysen identifiziert (Stapleton *et al.*, 2002). Die affinste Bindestelle enthält ein nahezu perfektes inverted repeat (TTAGCAAGCTAA, als Bindestelle I bezeichnet). Die anderen vier Bindestellen enthalten verwandte Sequenzen, die weniger affin gebunden werden. Daher wird angenommen, dass die Palindromsequenz der Bindestelle I die eigentliche Bindekonsensussequenz darstellt. Diese 12 bp Konsensus-Sequenz TTAGCAAGCTAA, findet sich teilweise in Bindestelle II des  $P_{slyA_{E.coli}}$  wieder.

Untersuchungen der DNA-Interaktion von RovA, mit dem SlyA innerhalb der MarR-Familie besonders nah verwandt ist, enthüllten ein hohes Vorkommen von AT und poly(AT)-Stücken innerhalb der RovA-Bindestellen im  $P_{inv}$  und  $P_{rovA}$  (Heroven *et al.*, 2004). In *Yersinia Pseudotuberculosis* wird RovA von den beiden Promotoren P1 und P2 transkribiert, die 76 und 343 Nukleotide stromaufwärts des Translationsstarts liegen (Heroven *et al.*, 2006). RovA induziert seine eigene Transkription bei moderaten Temperaturen (20 – 28°C), in der stationären Phase oder in reichem Medium durch die Bindung an eine AT-reiche Sequenz stromaufwärts von P2, indem es das reprimierend wirkende Protein H-NS von der DNA verdrängt. Eine bedeutende Rolle bei der RovA-DNA-Erkennung spielt dabei das Konsensus-Motif  $^A_TATTAT^A_T$  (Heroven *et al.*, 2004).

Wie im Fall von SlyA existiert auch eine RovA-Bindestelle, die stromabwärts von  $P1_{rovA}$  liegt.

Bei hoher RovA-Konzentration interagiert das Protein mit dieser niederaffinen Bindestelle und interferiert dabei mit der Bindung der RNAP. Die Bindung von RovA an diese Bindestelle wurde als Basis eines negativen Feedback-Mechanismus postuliert, der die Autorepression der *rovA*-Transkription bei hoher RovA-Konzentration ermöglicht (Heroven *et al.*, 2004). Die Bindung eines Transkriptions-Aktivators stromabwärts des Transkriptionsstartpunktes scheint ungewöhnlich, wurde jedoch auch für ein anderes Regulationssystem gezeigt: SlyA selbst bindet stromabwärts des Transkriptionsstarts von *pagC* und *ugtL* und aktiviert indirekt ihre Transkription durch eine Remodelierung des H-NS-gebundenen Promotors (Shi *et al.*, 2004; Navarre *et al.*, 2005). Ein Modell erklärt diese Beobachtung so, dass die Bindung die lokale Nukleoprotein-Struktur des bakteriellen Chromosoms remodelliert und der H-NS Bindung entgegenwirkt, so dass die Aktivierung durch den anderen Regulator PhoP begünstigt wird (Navarre *et al.*, 2005). Daher wird die Transkription von *ugtL* und *pagC* nur dann stark aktiviert, wenn sowohl SlyA als auch PhoP gleichzeitig anwesend sind (Kong *et al.*, 2008). Auch bei der Aktivierung der SPI-2 Transkripte in *Salmonella* bindet SlyA stromabwärts des Transkriptionsstartes und kompetitiert vermutlich mit den Repressoren H-NS, StpA, Hha und/oder YdgT um die Promotorbindung und erleichtert der RNA-Polymerase den Zugang (Yoon *et al.*, 2009).

Ein weiteres Gen, dessen Promotor von SlyA gebunden wird, ist das Hämolyisin-Gen *clyA*. Sein Transkriptionsstart liegt 56 Nukleotide stromaufwärts des Startcodons (Ludwig *et al.*, 1999; Wyborn *et al.*, 2004b). Der putative Promotor scheint ein schwacher Promotor der Klasse I zu sein. Er enthält eine ungewöhnliche -10 Region (TATGAAT), mit einem "zusätzlichen" G im Zentrum der Konsensus-Sequenz, das für die Regulation durch SlyA kritisch zu sein scheint. Die Sequenz wird durch eine GC-reiche Region mit optimaler Länge von einer konventionellen -35 Region (TTGACG) bei -32,5 getrennt. Eine Reduktion im G + C Gehalt der "Spacer"-Region verringerte deutlich die Fähigkeit von SlyA, die *clyA*-Expression zu aktivieren.

Durch DNaseI Protektions-Assays wurden weitere SlyA-spezifische Bindestellen in mehreren SlyA-regulierten Genen in *Salmonella* identifiziert: TTTTGTCTTAA (*ugtL*), TTTGGAATGTAA (*pagC*) und TTAGCTGTAA (*mig-14*) (Shi *et al.*, 2004; Navarre *et al.*, 2005).

Ersetzen von Basenpaaren in der Bindestelle I im *PslyA<sub>Salmonella</sub>* zeigte, dass die wichtigsten Basenpaare für die Erkennung von DNA durch SlyA an den 5'- und 3'- Enden der Konsensussequenz lokalisiert sind: **TTAGCAAGCTAA** (Haider *et al.*, 2008). Diese Positionen waren auch bei einem Alignment zu den SlyA-Bindestellen in *P<sub>pagC</sub>*, *P<sub>mig-14</sub>*, *P<sub>ugtL</sub>* und *P<sub>clyA</sub>* am stärksten konserviert. In identischer Weise finden sich diese Sequenzen in der in dieser Arbeit identifizierten Bindestelle I im *PslyA<sub>E.coli</sub>*. Erstaunlicherweise ist diese jedoch

die Bindestelle mit der niedrigsten Affinität für SlyA.

Ein weiteres wichtiges Motiv, an das das SlyA-Homodimer präferentiell bindet, scheint das inverted Repeat mit dem Core-Motiv TTAG darzustellen. Dieses Motiv wurde auch in den in dieser Arbeit identifizierten SlyA-Bindestellen IV, II und I in *PslyA<sub>E.coli</sub>* wiedergefunden, wobei IV und II mit relativ hoher Affinität gebunden werden und I mit niedriger. Das Motiv AGCA findet sich dagegen in allen fünf detektierten Bindestellen des *PslyA<sub>E.coli</sub>* und im *PslyA<sub>Salmonella</sub>* wieder und auch stromaufwärts in potentiellen Bindemotiven der SlyA-abhängigen Gene *araC*, *mirB*, *nmpC*, *rpoE*, *sdhC*, *slyB*, *yicP*, *sdhC*, *pdhR* und *rpsJ*. Es scheint ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen, über die in der Literatur bisher nicht berichtet wurde.

#### 4.2.2 Transregulatorische Faktoren

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass *slyA* in pathogenen und apathogenen *E. coli* Stämmen einer positiven Autoregulation unterliegt (vergleiche Kapitel 4.2.1). Die Promotordeletionsanalysen bzw. die Tatsache, dass *slyA* in den pathogenen *E. coli* Stämmen deutlich stärker exprimiert war, deuten auf das Vorhandensein weiterer regulatorischer Faktoren (z.B. Aktivatoren) von *slyA* hin, die entweder in K-12 fehlen oder Repressoren, die ausschließlich dort aktiv sind. In einem Genbank-Screening nach Faktoren aus EIEC 12860, die die *slyA*-Expression in *E. coli* K-12 induzieren können, wurde lediglich SlyA selbst identifiziert (A.-K. Wagner, unveröffentlichte Daten). Daher wurden im weiteren Verlauf Faktoren analysiert, die eine Rolle bei der Regulation SlyA-homologer Proteine spielen.

In *Salmonella* wird *slyA* unter niedrigen  $Mg^{2+}$ -Bedingungen von PhoP durch Bindung an eine stromaufwärts gelegene Promotorregion aktiviert (Norte *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2004). Studien anhand von *slyA-lacZ*-Fusionen zeigten, dass PhoP die *slyA*-Transkription verstärken kann (Norte *et al.*, 2003; Eguchi *et al.*, 2004), was darauf hindeutet, dass PhoP mit SlyA in einer transkriptionellen regulatorischen Kaskade interagiert. In Untersuchungen von Navarre *et al.*, 2005 wurde dagegen nur ein geringer Einfluss von PhoP/PhoQ auf die *slyA*-Expression beobachtet. Interessanterweise hatte PhoP/PhoQ jedoch einen starken Einfluss auf eine große Anzahl von SlyA-regulierten Genen, ohne dabei die Menge an SlyA-Protein selbst signifikant zu verändern (Navarre *et al.*, 2005). Als Erklärung für diese koordinierte Regulation einer Vielzahl an Genen durch SlyA und PhoP/PhoQ wurden zwei Modelle vorgeschlagen (Navarre *et al.*, 2005): Im ersten übt PhoP/PhoQ einen regulatorischen Effekt aus, indem es die Fähigkeit von SlyA ändert, als Transkriptionsaktivator zu wirken. In diesem Zusammenhang könnte die Aktivierung von PhoP/PhoQ in der Änderung der Konzentration eines SlyA-Liganden resultieren, der die Bildung des Aktivatorkomplexes durch SlyA unterstützt oder seine Affinität für Promotoren

erhöht. Somit scheint SlyA und nicht PhoP der eigentliche Regulator von vielen PhoP/SlyA-koregulierten Genen zu sein. In sechs von zwölf untersuchten PhoP-abhängigen Genen wurde eine konservierte PhoP-Box mit der Sequenz (G/T)GTTTA(A/T) gefunden (Lejona *et al.*, 2003). Diese fehlt jedoch beispielsweise im *pagC*-Promotor (Lejona *et al.*, 2003) und PhoP interagiert nicht direkt mit  $P_{pagC}$  (Navarre *et al.*, 2005), was diese Theorie unterstützt. Das zweite Modell postuliert, dass jeder PhoP/SlyA-koregulierte Locus Bindestellen für beide Transkriptionsfaktoren besitzt, wie es bei *ugtL* der Fall ist. SlyA könnte wie RovA als ein Antirepressor wirken, der mit dem H-NS Protein um Bindestellen in der Promotor-Sequenz kompetitiert (Heroven *et al.*, 2004; Wyborn *et al.*, 2004b). Dazu könnte SlyA die lokale Nukleoproteinstruktur des bakteriellen Chromosoms umformen. Dieses Modell würde auch die Bindung von SlyA stromabwärts des *ugtL*- und *pagC*- Transkriptionsstartpunktes erklären, eine ungewöhnliche Position für die Bindestelle eines Transkriptionsaktivators, der direkt mit der RNA-Polymerase interagiert (Shi *et al.*, 2004). Darüber hinaus wird der zelluläre PhoP-Level in *Salmonella* durch SlyA reguliert: SlyA bindet an die *phoPQ*-Promotorregion und aktiviert dabei die PhoP-Autoregulation über einen positiven feedback Mechanismus (Song *et al.*, 2008): Das PhoP-Protein bindet an die PhoP-Box und autoaktiviert die *phoP*-Transkription, während das H-NS-Protein mit einer benachbarten Sequenz interagiert und diesen Prozess inhibiert (Kong *et al.*, 2008). Die SlyA-Bindestelle überlappt mit dem H-NS-Bindemotif und vermutlich konkurrieren SlyA und H-NS daher um die Bindung am *phoPQ*-Promotor (Song *et al.*, 2008). Somit besteht ein Zusammenhang zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren PhoP und SlyA, der für die Virulenz von *Salmonella* von Bedeutung sein könnte.

Ein Zusammenhang zwischen beiden Transkriptionsfaktoren in *E. coli* kann anhand der Daten der vorliegenden Arbeit nicht angenommen werden. Die untersuchte Deletion des PhoP/Q Zwei-Komponenten-Systems wirkte sich weder auf die Expression des *slyA*-Gens aus *E. coli* K-12 noch auf die des Gens aus EIEC 12860 aus und das *phoP/Q*-Operon wurde durch die Transkriptom-Analyse nicht als SlyA-aktiviert detektiert.

Eine zur PhoP-Box ähnliche Nukleotidabfolge wurde in der regulatorischen Region von *slyA* in *E. coli* nicht gefunden, aber auch die *slyA*<sub>*Salmonella*</sub> Promotorregion weist keine solche Erkennungssequenz auf (Norte *et al.*, 2003). In *Salmonella* wird nur der stromaufwärts gelegene Transkriptionsstart von PhoP beeinflusst. Dieser konnte in *E. coli* K-12 und EIEC in der vorliegenden Arbeit durch Primer-Extension nicht nachgewiesen werden, was die Diskrepanz der *slyA*-Regulation durch PhoP in *E. coli* und *Salmonella* erklären könnte. Das SlyA-Protein aus *Salmonella* und das aus *E. coli* sind zwar zu 89% identisch, trotzdem haben sie eine sehr unterschiedliche Funktion, und die funktionelle Verbindung zwischen dem SlyA- und PhoP-Regulon in *Salmonella* entstand vermutlich, als die Gattung *Salmonella* ihren getrennten pathogenen Lebensstil entwickelte (Navarre *et al.*, 2005).

Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung von Song *et al.* (2008) bestätigt, dass SlyA nicht in den Regulationszyklus von PhoP/PhoQ in *E. coli* integriert ist.

SlyA wie auch die Homologen Regulatoren RovA und PecS aktivieren vermutlich die Genexpression, indem sie als Antirepressoren des Nukleoid-assoziierten Proteins H-NS agieren (Ellison & Miller, 2006). H-NS ist ein globaler Regulator, der die Genexpression oft in Anpassung an Umweltbedingungen wie Temperatur und Osmolarität reguliert (Schroder & Wagner, 2002). Die Expression von 5% aller *E. coli* Gene wird durch dieses Protein kontrolliert (Hommais *et al.*, 2001), wobei der direkte Einfluss auf die Transkription von einigen Ausnahmen abgesehen (Johansson *et al.*, 1998; Starcic-Erjavec, 2003) generell negativ ist. Es wurde jedoch nachgewiesen, dass H-NS bei der Regulation der Transkription der K5 Kapselgene eine doppelte Rolle spielt: so reprimiert es deren Transkription bei 20°C, ist aber für die maximale Expression bei 37°C erforderlich. Dabei kommt es zu einer neuartigen Interaktion zwischen SlyA und H-NS, die für die SlyA-vermittelte Aktivierung der Transkription von Promotor PR1 (Corbett *et al.*, 2007) und PR3 nötig ist (Xue *et al.*, 2009). In Anwesenheit von SlyA wird das H-NS Protein dabei nicht ersetzt, sondern es entsteht ein neuer Nucleoprotein-Komplex aus H-NS und SlyA am PR3 (Xue *et al.*, 2009).

H-NS bindet an keine spezifische DNA-Sequenz, sondern erkennt AT-reiche, intrinsisch gebogene DNA (Atlung & Ingmer 1997; Schroder & Wagner 2002; Dorman, 2004). Die Hauptrolle von H-NS besteht in der sog. "xenogenen Stilllegung" mit der die Expression von horizontal erworbenen Genen verhindert wird, zu erkennen an deren unnormales hohes AT-Gehalt. Eine Reduktion der Fitness durch die fremde DNA soll auf diese Weise verhindert werden (Navarre *et al.*, 2006).

SlyA wie auch das SlyA-Homolog RovA konkurrieren vermutlich mit dem H-NS Protein um Bindestellen innerhalb von bestimmten Promotorsequenzen (Heroven *et al.*, 2004), um die Aktivierung eines Promotors durch klassische Aktivatoren wie PhoP oder OmpR zu ermöglichen. RovA reguliert beispielsweise die temperaturabhängige Transkription des Außenmembranproteins und wichtigsten Invasionsfaktors Invasin und seines eigenen Gens in *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* (Revell & Miller, 2000; Nagel *et al.*, 2001) durch Antirepression von H-NS (Heroven *et al.*, 2004; Ellison & Miller, 2006). H-NS bindet an AT-reiche Sequenzen im *rovA*- bzw. *inv*-Promotor und verhindert so deren Transkription. In Anwesenheit von RovA kann dieses jedoch an mit der H-NS-Bindestelle überlappende Sequenzen binden und so H-NS vom Promotor verdrängen und die Expression aktivieren (Heroven *et al.*, 2004). Interessanterweise konnte eine starke Derepression der Expression einer *rovA-lacZ*-Fusion in einer *E. coli hns*-Mutante beobachtet werden (Heroven *et al.*, 2004). Die Vermessung einer *slyA-lacZ*-Fusion in der vorliegenden Arbeit zeigte jedoch

keine H-NS-Abhängigkeit des *slyA*<sub>*E. coli*</sub>-Promotors. Sowohl in *E. coli* K-12 als auch in EIEC wurden die Fusionen durch die Mutation des *hns*-Gens nur geringfügig induziert. Die demzufolge H-NS-unabhängige Expression von *slyA* in *E. coli* steht im Einklang mit dem Fehlen von *slyA* in Transkriptom- und Proteomanalysen von *E. coli hns*-Mutanten (Hommais *et al.*, 2001). Die Konsensussequenz von SlyA im PslyA ist nicht wirklich AT-reich und stellt daher keine typische H-NS Bindestelle dar.

Ein weiterer potentieller Regulator von *slyA*<sub>*E. coli*</sub> ist der Regulator LrhA. Die LrhA/HexA/PecT/RovM Proteine gehören zur Familie der LysR-Typ Transkriptions-Regulatoren. Proteine dieser Familie sind an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt, um optimales Überleben und Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen zu gewährleisten (Schell, 1993). Einige LysR-Regulatoren wie CrgA von *Neisseria gonorrhoeae*, AphB von *Vibrio cholerae* und SpvR von *S. typhimurium* sind für die Regulation der Zelladhäsion und die Virulenz von humanen Pathogenen wichtig (Kovacikova & Skorupski, 1999; Deghmane *et al.*, 2000).

Die Transkription von *rovA* in *Y. pseudotuberculosis* steht unter negativer Kontrolle des LysR-Typ Regulators RovM (Heroven & Dersch, 2006). RovM reprimiert durch Bindung an den *rovA*-Promotor in Kooperation mit H-NS die *rovA*-Transkription und beeinflusst die Invasion, Virulenz und Motilität von *Yersinia* (Heroven & Dersch, 2006). Es weist besonders große Homologie zu den Virulenzregulatoren PecT und HexA von pflanzenpathogenen *Erwinia* Arten auf sowie zu LrhA in *E. coli*. Expressionsstudien in der vorliegenden Arbeit zeigten jedoch, dass das RovM-Homolog LrhA in *E. coli* die Transkription von *slyA* nicht kontrolliert. Die Aktivität des *slyA*-Promotors aus *E. coli* K-12 und aus EIEC wurde weder durch die Deletion von *lrhA* noch durch Überexpression von dessen Genprodukt beeinflusst.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass viele regulatorischen Komponenten, die für die Expression von SlyA-Homologen in verwandten Bakterien wie *Salmonella* und *Yersinia* essentiell sind, für die *slyA*-Regulation in *E. coli* keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen. Erkenntnisse, die über die nahe verwandten Regulatoren RovA aus *Yersinia* und SlyA aus *Salmonella* gewonnen wurden, können demnach nicht einfach auf SlyA aus *E. coli* übertragen werden.

Vielmehr konnte hier erstmalig für einen Vertreter der MarR/SlyA-Familie gezeigt werden, dass die *slyA*-Transkription durch den alternativen Sigmafaktor RpoS ( $\sigma_{28}$ ) negativ reguliert wird, und dass unterschiedliche RpoS-Mengen in verschiedenen *E. coli* Isolaten die Ursache für die divergente *slyA*-Synthese sind. Die RpoS-Synthese wurde dazu in neun pathogenen *E. coli* Stämmen und vier apathogenen Stämmen anhand eines gegen RpoS gerichteten polyklonalen Antikörpers immunologisch verglichen. Darüber hinaus wurde die Expression

von *lacZ* unter der Kontrolle eines synthetischen, ausschließlich RpoS-abhängigen Promotors analysiert. Sieben der neun untersuchten pathogenen Isolate synthetisierten signifikant weniger RpoS oder nur Abbruchprodukte, und alle neun enteropathogenen Stämme wiesen eine signifikant niedrigere Expressionsrate des RpoS-abhängigen Promotors auf als in *E. coli* K-12. Diese Beobachtungen deuteten stark auf den niedrigeren RpoS-Spiegel oder eine niedrigere RpoS-Aktivität als Ursache der höheren *slyA*-Expression in den enterischen pathogenen *E. coli* Stämmen hin.

Da RpoS als Transkriptionsaktivator fungiert, übt es seinen repressiven Effekt auf *SlyA* wahrscheinlich indirekt aus: RpoS könnte die Synthese eines bisher unbekannten Repressors von *slyA* kontrollieren. Die Inaktivierung von *rpoS* führte zu einer deutlichen Induktion der Expression von *slyA* in *E. coli* K-12 und in einer *rpoS*-Mutante wurden signifikant höhere *SlyA*-Mengen synthetisiert. In beiden Fällen war der Effekt in der stationären Phase besonders deutlich.

Die chromosomale Region in der Umgebung des *rpoS*-Gens weist einen hohen DNA-Polymorphismus auf und ist in kommensalen und pathogenen *E. coli* Stämmen hochgradig variabel (Herbelin *et al.*, 2000). Davon ist besonders stark die Region zwischen *rpoS* und dem benachbarten Gen *mutS*, einem Protein zur Behebung von Fehlpaarungen, betroffen. Diese Region hat einen evolutionären Wandel von einer langen Sequenz in einem ursprünglichen *E. coli* Stamm zu zwei unterschiedlichen verkürzten Formen vollzogen. Die anfängliche Region enthielt zwei Segmente, die durch zwei unabhängige Deletionen in *E. coli* K-12 und EHEC O157:H7 und O55:H7 separat verloren gegangen sind, so dass diese Stämme nur jeweils eins der beiden Segmente enthalten, während in EHEC-Isolaten anderer Serotypen und EPEC Stämmen beide gefunden wurden. Mehrere EPEC Serotypen weisen darüber hinaus eine zusätzliche Insertion benachbart zu der *mutS-rpoS* Region auf. In diesem Zusammenhang wurde auch von einer Punktmutation in einer Variante von EHEC EDL933 berichtet, die durch entstehen eines Stop-Codons innerhalb der kodierenden *rpoS*-Sequenz zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation der *rpoS*-mRNA führt (Coldewey *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde deutlich, dass *rpoS*-Mutanten in klinischen *E. coli* Isolaten unterschiedlicher Pathotypen häufig auftreten. Auch in anderen klinischen Isolaten von EHEC und *E. coli* K1 wurden Mutanten mit Funktionsverlust des *rpoS*-Lokus identifiziert (Wang & Kim, 2000; Dong *et al.*, 2009). Da RpoS für die Stressresistenz, das Überleben und die Virulenz von *E. coli* eine wichtige Rolle spielt (Price *et al.*, 2000; Wang & Kim, 2000; Laaberki *et al.*, 2006), scheint das Auftreten derartiger Mutanten mit Funktionsverlust von *rpoS* widersprüchlich. Dem gegenüber stehen jedoch *rpoS*-defiziente klinische Isolate von EHEC, die sich in oralen Infektionsmodellen als hoch virulent erwiesen (Gunzer *et al.*, 2002) und eine *rpoS*-Mutante von *E. coli* BJ4, die im Mausmodell eine bessere Besiedlung des



Darmes zeigte als der Wildtyp (Krogfelt *et al.*, 2000). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass ein funktionelles *rpoS*-Gen während den frühen Phasen der Kolonisation einen Nachteil darstellen könnte. Der Verlust von *rpoS* könnte die allgemeine Fitness aufgrund verstärkter Expression von negativ RpoS-abhängigen Genen erhöhen und *E. coli* so einen Selektionsvorteil verschaffen. In diesem Zusammenhang wurde vom vermehrten Auftreten von *rpoS*-Mutanten in bakteriellen Populationen berichtet, die einer Nahrungsknappheit unterworfen waren oder bei Wachstum auf schwachen Succinat- und Acetat-Quellen (Notley-McRobb *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2009). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass neben den metabolischen Veränderungen jedoch auch Virulenzfaktoren in Abwesenheit von RpoS verstärkt produziert werden, da über die Induktion von SlyA u.a. die Expression des Cytotoxins ClyA und des Zwei-Komponenten-Systems EvgAS aktiviert wird (siehe folgende Kapitel). Das EvgAS System induziert die Glutamat-abhängige Säureresistenz (Masuda & Church, 2002; 2003; Nishino *et al.*, 2003), so daß hier möglicherweise ein Weg zur Induktion der Säureresistenz eingeschlagen werden kann, der RpoS-unabhängig ist. Hinweise auf das Vorhandensein einer solchen alternativen Route liefern Studien an Isolaten, die trotz RpoS-Defizienz Säure-Toleranz aufweisen (Coldewey *et al.*, 2007). Solche Mutanten könnten aufgrund des veränderten Expressionsprofils ihrer Stoffwechselgene und der erhöhten Syntheserate des globalen Virulenzregulators SlyA einen selektiven Vorteil beim Wachstum und Überleben im Wirt während bestimmter Infektionsstadien besitzen.

### 4.3 Das SlyA-Regulon

In *Salmonella typhimurium* konnte das SlyA-Transkriptom bereits aufgeklärt werden (Navarre *et al.*, 2005). Dabei wurden 23 durch SlyA aktivierte und acht reprimierte Gene identifiziert. Viele davon sind durch horizontalen Gentransfer erworben worden. Zahlreiche dieser Gene werden neben SlyA durch das Zweikomponenten-System PhoP/Q (*pagC*, *pagD*, *ugtL*, *mig-14*, *virK*, *phoN*, *pgtE*, *pipB2*, *sopD2*, *pagJ*, *pagK*) (Belden & Miller, 1994; Miller *et al.*, 1998; Guina *et al.*, 2000; Brodsky *et al.*, 2002; Brumell *et al.*, 2003; Detweiler *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2004) oder OmpR (*ssrAB*) koreguliert (Navarre *et al.*, 2005). So besitzen manche Loci (z. B. *ugtL*) Bindestellen sowohl für PhoP als auch für SlyA.

Möglicherweise könnte SlyA als Antirepressor fungieren, um die Aktivierung der Gene durch PhoP zu ermöglichen, oder PhoP könnte die SlyA-Aktivität durch einen löslichen Liganden kontrollieren; so könnte Liganden-freies SlyA seine eigene Transkription reprimieren und bei Bindung des Liganden vom Promotor dissoziieren oder seine Transkription aktivieren (Navarre *et al.*, 2005). Bei vielen der MarR-homologen Proteine führt die Assoziation mit einem niedermolekularen Liganden zu einer Konformationsänderung und damit zur Senkung der Affinität für DNA, so dass es zur Derepression und dem Fortschreiten der Transkription

kommt (reviewed in Wilkinson & Grove, 2006), so reagiert z. B. HucR (hypothetischer Uricase Regulator) auf Urat, ein Zwischenprodukt des Purin-Abbaus (Perera *et al.*, 2009) und einige Proteine in der MarR-Familie binden phenolische Komponenten wie Salicylat, das als Inhibitor von MarR bekannt ist (Aleksun & Levy, 1999). SlyA aus *Salmonella typhimurium* wurde mit Salicylat als Liganden kokristallisiert (PDB 3DEU; Brzovic *et al.*, unpublizierte Daten).

Navarre (2005) charakterisierte SlyA als Regulator einer Vielzahl von Virulenzfaktoren in *S. typhimurium*, deren Mehrheit in der Zellmembran oder im Periplasma lokalisiert ist oder auf der Oberfläche exponiert wird. Daraus wurde als eine der Hauptaufgaben von SlyA die Veränderung der bakteriellen Zelloberfläche zum Schutz vor Verteidigungsmechanismen des Wirtes abgeleitet.

Durch Proteomanalysen von Stapleton *et al.* (2002) in *Salmonella* wurde ein fast vollständig anderes Set von Proteinen als SlyA-abhängig identifiziert (FliC, OmpA, OmpC, OmpF, IroN), lediglich *pagC* wurde in beiden Ansätzen detektiert. Ebenso unterschiedlich fiel das Ergebnis der Proteomanalyse von Spory *et al.* (2002) aus, jedoch wurde auch hier ein Außenmembranprotein detektiert (OmpD) und FliC wurde auch in dieser Analyse als SlyA-induziert identifiziert. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind möglicherweise auf die geringere Sensitivität der Proteomanalyse zurückzuführen, sowie auf Unterschiede bei den Anzuchtbedingungen. Darüber hinaus wurde in der Analyse von Spory *et al.* u.a. das Proteom des Wildtyps dem des *slyA*-Überexpressionsstammes gegenübergestellt, so dass auch artifizielle Aktivierung/Repression von Genen detektiert werden könnte, die beim Vergleich von Wildtyp und Mutante nicht auftritt.

Bei der Analyse des SlyA-Proteoms in EIEC (Spory *et al.*, 2002) wurden beim Vergleich eines SlyA-überproduzierenden Stammes und einer *slyA*-Mutante mit dem korrespondierenden Wildtyp mittels Massenspektrometrie 20 putativ von SlyA positiv regulierte und 13 putativ von SlyA reprimierte Proteine identifiziert. Daraus wurde gefolgert, dass SlyA sowohl als Aktivator, als auch als Repressor der Transkription in EIEC fungiert. Zu den SlyA-induzierten Proteinen gehörten mehrere Chaperone, z.B. GroEL, GroES, DnaK, GrpE und CbpA und auch Proteine, die in die Säureresistenz involviert sind, wie z.B. HdeA, HdeB und GadA, sowie das "starvation lipoprotein" (Slp), das Cytolysin ClyA (HlyE) und in diverse metabolische Wege involvierte Enzyme. Die Hitzeschockproteine GroEL, GroES, DnaK und GrpE stehen unter Kontrolle des alternativen Hitze-Sigma-Faktors  $\sigma^{32}$  (RpoH) (Tomoyasu *et al.*, 1998; Bianchi & Baneyx, 1999). CbpA, HdeA, HdeB, GadA und HyaB werden dagegen von dem alternativen Stress-Sigma-Faktors  $\sigma^s$  (RpoS) kontrolliert. Bei SlyA von *E. coli* handelt es sich demnach ähnlich wie bei SlyA aus *Salmonella* mehr um einen globalen als um einen spezifischen Regulator der Genexpression. Da die meisten dieser SlyA-regulierten Gene bzw. Gencluster durch verschiedene Stresse aktiviert werden, wird

angenommen, dass die Expression von *slyA* in EIEC und *Salmonella* nach der Aufnahme in Makrophagen durch die Ansäuerung der Vakuole erfolgt. GroEL und DnaK könnten während der Makrophageninfektion die bakteriellen makromolekularen Komplexe stabilisieren, die den toxischen und degradierenden Produkten der Makrophagen ausgesetzt sind. Zu der Gruppe der reprimierten Proteine gehörten größtenteils biosynthetische Enzyme. Damit in Einklang erwies sich die EIEC *slyA*-Mutante als weniger resistent gegenüber Hitze und Säurestress verglichen mit dem Wildtyp.

Keines der putativen SlyA-regulierten Gene in EIEC 12860 (Spory *et al.*, 2002) stellt einen bekannten Virulenzfaktor dar: alle diese Gene sind auch in *E. coli* K-12 vorhanden. Trotzdem können einige dieser Gene eine Rolle in der Pathogenese spielen, wie z. B. *clyA*, das in *E. coli* K-12 stillgelegt ist, aber in EIEC stärker exprimiert wird und durchaus als potentieller Virulenzfaktor während der Infektion agieren könnte. Mehrere weitere putative SlyA-induzierte Proteine in EIEC 12860 sind an der Stressantwort beteiligt und unterstützen somit das Überleben der Bakterien unter den verschiedenen Stressbedingungen während der Wirtsinfektion. So zeigt eine *slyA*-Mutante eine verminderte Resistenz gegenüber Hitze- und Säurestress im Vergleich zum Wildtyp. *Salmonella* und EIEC verfolgen beide eine invasive Pathogenese-Strategie und bei beiden Pathogenen gilt die Regulation bestimmter Stressgene durch SlyA als signifikant für ihr Überleben und/oder die Replikation innerhalb von Phagocyten (Spory *et al.*, 2002). Trotzdem sind die SlyA-Regulons in *Salmonella* und EIEC nicht identisch und überlappen nur im Fall von GroEL (Spory *et al.*, 2002).

Welche Rolle spielt SlyA dagegen in der Pathogenese von enterohämorrhagischen *E. coli* wie z. B. EHEC und welche in dem apathogenen Stamm *E. coli* K-12, in dem die *slyA*-Expression deutlich niedriger ist? Die Frage nach Unterschieden und Gemeinsamkeiten zwischen den SlyA-Regulons von *E. coli* K-12 als einem kommensalen und EHEC EDL933 als einem enterohämorrhagischen *E. coli* Stamm sollte anhand von Transkriptomanalysen aufgeklärt werden, und aus den Ergebnissen Schlußfolgerungen über die Rolle von SlyA in beiden *E. coli* Varianten abgeleitet werden. Dabei wurden die Transkriptionsprofile von Wildtyp, *slyA*-Mutante und SlyA-überproduzierendem Stamm von *E. coli* K-12 bzw. EHEC EDL933 gegenübergestellt:

In *E. coli* K-12 wurde die Expression von insgesamt 31 Genen positiv und 43 Genen negativ durch Mutation oder Überexpression von SlyA beeinflusst. Der Effekt von Mutation und Überexpression unterschied sich grundlegend. Nur ein Gen, *slyA* selbst, wurde in beiden Ansätzen als positiv reguliert detektiert. Durch die Mutation wurden zwölf Gene induziert und sechs Gene reprimiert, die Überexpression führte zur Induktion von 20 Genen und zur Repression von 37 Genen.

In EHEC EDL933 wurde die Expression von 105 Genen positiv und von 22 Genen negativ durch Überexpression und Repression von SlyA beeinflusst. Auch hier gab es starke Unterschiede zwischen der Wirkung des Gen „knock-outs“ und der Überexpression von SlyA, da durch erstere nur die Transkription eines einzigen Gens, *gadX*, induziert wurde und die von zwei Genen, ECS4585 und ECS4586, reprimiert wurde. Die Überexpression dagegen bewirkte die Induktion der Expression von 104 Genen und Repression von 20 Genen, inklusive ECS4585 und ECS4586. Generell ist zu berücksichtigen, dass durch die Mikroarray-Methode nur eine Auswahl der Gene detektiert wird, die differentiell exprimiert sind. Eine höhere Reproduzierbarkeit erreicht man nur durch eine Erhöhung der Anzahl an Replikaten.

Weitere Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse von Mutations- und Überexpressions-Experiment können in der Qualität der Mikroarray-Ergebnisse zu finden sein, die z.T. durch räumliche Effekte auf dem Mikroarray-Träger negativ beeinflusst wird. So wurden mitunter Schlieren auf dem Träger festgestellt, die zu einer inhomogenen Verteilung der Intensität der unspezifischen Hintergrund-Fluoreszenz über die Fläche des Arrays führten. Darüber hinaus wurde ein Effekt beobachtet, der vermutlich auf abnehmende Qualität der beim spotten eingesetzten Nadeln zurückzuführen ist. Dabei traten einzelne Spots mit irregulären Formen auf, die bei der automatischen Zuordnung der Gitter-Kreise nicht optimal erfasst wurden. Die Zuordnung der Gitter-Kreise zu diesen Spots wurde soweit möglich per Hand korrigiert.

Sieben Gene wurden bei *slyA*-Überexpression sowohl im SlyA-Transkriptom von *E. coli* K-12 als auch in dem von EHEC identifiziert: *slyA* selbst, das Toxin-Gen *clyA* (*hlyE*) und zwei Gene mit unbekannter Funktion (*yedA*, *ydhS*) wurden in beiden Stämmen durch *pslyA*<sup>+</sup> induziert. Das in den Aminosäuremetabolismus involvierte Gen *aceE* und zwei Untereinheiten der Cytochrom O Ubiquinol Oxidase (*cyoC*, *cyoB*) wurden dagegen durch *pslyA*<sup>+</sup> in EHEC induziert und in *E. coli* K-12 reprimiert, sind also gegensätzlich reguliert. Der Vergleich der Transkriptome mit dem bereits bekannten Proteom von EIEC (Spory *et al.*, 2002) zeigte, dass die SlyA-Regulons von *E. coli* K-12 und EIEC in sechs Genen übereinstimmen: *hdeA*, *hdeB* und *clyA* wurden in beiden Stämmen durch SlyA induziert, *mopA*, *mopB* und *dnaK* waren in EIEC positiv und in *E. coli* K-12 negativ reguliert. Nur ein Gen des EIEC- und *Salmonella*-Regulons, *clyA*, gehört auch zum EHEC-SlyA-Regulon.

Die Tatsache, dass durch die *slyA*-Mutation nur das Transkriptionsprofil von sehr wenigen Genen beeinflusst wurde, lässt sich in *E. coli* K-12 möglicherweise dadurch erklären, dass *slyA* in diesem Stamm reprimiert ist. Der Befund, dass die Mutation auch in EHEC kaum eine Veränderung des Transkriptions-Profiles hervorgerufen hat, ist dagegen überraschend. Im Fall von EIEC 12860 wurde der Großteil der identifizierten SlyA-regulierten Proteine beim Vergleich von Wildtyp und Mutante detektiert, während in *Salmonella* die meisten SlyA-

abhängigen Proteine beim Vergleich von Überexpressionsstamm und Mutante detektiert wurden (Spory *et al.*, 2007). Eine mögliche Erklärung für diesen Umstand könnte sein, dass die Stämme unterschiedliche Konzentrationen an SlyA für die Regulation benötigen. In Anbetracht des Modelles, nachdem SlyA als Derepressor durch Kompetition um Promotor-Bindestellen mit einem Proteinkomplex aus H-NS und Hha wirkt (Nieto *et al.*, 2002; Madrid *et al.*, 2002; Wyborn *et al.*, 2004b) ist es vorstellbar, dass diese Derepression erst ab einer gewissen SlyA-Menge erreicht werden kann und SlyA seine Wirkung nur unter stark induzierenden Bedingungen bzw. bei Überexpression entfaltet.

In *E. coli* K-12 scheint SlyA vor allem eine Rolle bei der Regulation des Stoffwechsels zu spielen: Die meisten der in *E. coli* K-12 detektierten SlyA-abhängigen Gene sind in Stoffwechselprozesse involviert und werden bis auf sechs Gene durch SlyA reprimiert. In EHEC wurden 16 in den Metabolismus involvierte Gene als SlyA-abhängig detektiert, die bis auf vier positiv reguliert sind. Auch in EIEC 12860 und *Salmonella* serovar Typhimurium gehören mehrere in metabolische Prozesse involvierte Proteine zum SlyA-Proteom (Spory *et al.*, 2002). In *Yersinia* spielen viele der RovA-regulierten Loci eine putative Rolle im Wirtsmetabolismus (Cathelyn *et al.*, 2007) und sind direkt in den Kohlenstoff- und Aminosäure-Stoffwechsel involviert sowie an Aufnahmesystemen für Zucker (Tran-Winkler, unveröffentlichte Daten).

Aus dem Vergleich der SlyA-Transkriptome in *E. coli* K-12 und EHEC EDL933 sowie dem Proteom in EIEC 12860 lässt sich als Gemeinsamkeit am deutlichsten die Funktion von SlyA bei der Regulation der Stressresistenz und hier vor allem der Säureresistenz interpretieren. In EHEC EDL933 wurden die Stressgene *dps*, *cutC* und *lysU* als SlyA-reprimiert detektiert, das Gen *z3918* ist SlyA-aktiviert. Neun Gene sind in *E. coli* K-12 in die Stressresistenz involviert, wobei vier Hitzeschockgene reprimiert und vier Säureresistenzgene und ein generelles Stressgen (*ytfE*) induziert werden. Unter den Säureresistenzgenen befindet sich auch der wichtige positive Regulator der glutamatabhängigen Säureresistenz, EvgA, sowie GadX, ebenfalls ein Aktivator der Säureresistenz. Auch durch die SlyA-Proteomanalyse in EIEC 12860 wurden mehrere Säurestress-Proteine und molekulare Chaperone detektiert (Spory *et al.*, 2002), darunter GroEL, ein Chaperon, das auch zum SlyA-Proteom von *Salmonella* serovar Typhimurium gehört. Der Befund, dass SlyA in EIEC die zelluläre Konzentration mehrerer Hitzeschock- und Säurestressproteine aktiviert, stimmt auch mit der Beobachtung überein, dass die Resistenz einer EIEC 12860 *slyA*-Mutante gegenüber Hitze- und Säurestress verglichen mit dem Wildtyp und *slyA*-Überexpressionsstamm vermindert ist (Spory *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurde eine Rolle von SlyA in der Resistenz von

*Salmonella* serovar Typhimurium gegenüber oxidativem Stress nachgewiesen (Buchmeier *et al.*, 1997).

Viele Gene mit bekannter Funktion im Transkriptom von EHEC EDL933 sind in Transport- und (TypIII-)Sekretions-Prozesse involviert, ihre Expression wurde ausschließlich induziert. Ausserdem wurden drei Motilitätsfaktoren von EHEC durch die Überexpression von SlyA reprimiert, darunter FliA, der essentielle positive Regulator des Flagellen-Regulons. Fünf Adhäsionsfaktoren oder Fimbrien wurden bei Überexpression von SlyA induziert, darunter Intimin, das bisher wichtigste Adhäsion von EHEC.

Des weiteren scheint SlyA in die Virulenz von EHEC involviert zu sein, da mehrere translozierte Effektoren und Virulenzgene durch SlyA induziert wurden. *espA*, *espB*, *espD*, *tir* und *stx2A* besitzen kein Homolog in *E. coli* K-12, nur *clyA* wird in beiden Stämmen durch SlyA aktiviert und wird auch in EIEC 12860 durch SlyA aktiviert (Spory *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit wurde durch die Proteomanalyse kein bekannter Virulenzfaktor unter den SlyA-regulierten Genen in EIEC identifiziert, da alle detektierten Gene auch in *E. coli* K-12 vorhanden sind und auch die in *Salmonella* detektierten Gene stellen keine typischen Virulenzfaktoren dar (Spory *et al.*, 2002). Dennoch wird SlyA für die Virulenz von *Salmonella* serovar Typhimurium in Mäusen benötigt und für das Überleben in murinen Makrophagen und Payerschen Plaques (Libby *et al.*, 1994; Daniels *et al.*, 1996), sowie für die Zerstörung der murinen M-Zellen (Daniels *et al.*, 1996) und auch das Ergebnis der vorliegenden Arbeit weist auf eine wichtige Rolle von SlyA in der Virulenz von EHEC hin. Zum Transkriptom von EHEC EDL933 gehören darüber hinaus 64 Gene, deren Funktion zum jetzigen Zeitpunkt unbekannt ist, und die daher in die Interpretation der SlyA-Funktion in EHEC nicht einbezogen werden konnten, die aber möglicherweise ebenfalls Virulenzfaktoren darstellen könnten. Auch repräsentieren die in dieser Arbeit identifizierten Gene offensichtlich nicht das gesamte SlyA Regulon von *E. coli* K-12 und EHEC, da eine Vielzahl der detektierten Gene in Operons lokalisiert sind, von denen nicht alle Mitglieder durch den Assay identifiziert wurden. Es ist also wahrscheinlich, dass andere Gene dieser Operons ebenfalls durch SlyA reguliert werden. Mehrere SlyA-aktivierte oder –reprimierte Gene werden möglicherweise unter den *in vitro* Kultivierungsbedingungen, die in dieser Arbeit angewendet wurden, nicht exprimiert. Sie benötigen gegebenenfalls andere Stimuli zur Induktion, die z. B. während der Infektion des Wirtes *in vivo* angetroffen werden. Ebenso ist es vorstellbar, dass auch *slyA* selbst durch ein Signal bei der Infektion stimuliert wird und so einen Einfluss auf die Genexpression ausübt, der mit der Situation bei Überexpression von *slyA* vergleichbar ist.

Generell lässt sich sagen, dass die Mitglieder der SlyA/RovA-Familie vermutlich als Aktivatoren wirken, indem sie direkt mit der RNAP interagieren oder als Derepressoren von H-NS fungieren (Tran *et al.*, 2005). Durch die Konkurrenz mit Aktivatoren oder der RNAP um Bindestellen können sie dagegen auch als Repressoren der Genexpression wirken (Heroven *et al.*, 2004; Wyborn *et al.*, 2004b). Die Regulons dieser Proteine scheinen dementsprechend groß zu sein, was im Hinblick auf ihre Konkurrenz mit H-NS sinnvoll erscheint, da H-NS die Expression einer Vielzahl von Genen beeinflusst. Bis auf eines werden alle Gene des RovA-Regulons von H-NS reprimiert (Cathelyn *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu ist bisher nur von sechs der durch die Transkriptomanalyse als SlyA-abhängig identifizierten Operons bekannt, dass sie durch H-NS reguliert werden (*hdeA,B*; *hdeD*; *nirBDC-cysG*; *srlAEBD-gutM-SrlR-gutQ*; *clyA* und *gadX*). Die Expression von mehreren der detektierten Gene wird außer von SlyA auch von CRP und ArcA beeinflusst.

Offensichtlich bestehen große Unterschiede zwischen den SlyA-Regulons der betrachteten Enterobacteriaceen. Die Unterschiede sind möglicherweise auf die andersartigen Pathogenese-Strategien zurückzuführen, da EIEC und *Salmonella* invasive Organismen sind, EHEC und EPEC dagegen A/E-Läsionen hervorrufen, während *E. coli* K-12 apathogen ist. Somit sind sie während der Infektion verschiedenen Umweltinflüssen ausgesetzt.

#### **4.4 SlyA-Induktion des Glutamat-abhängigen Säureresistenzsystems in *E. coli***

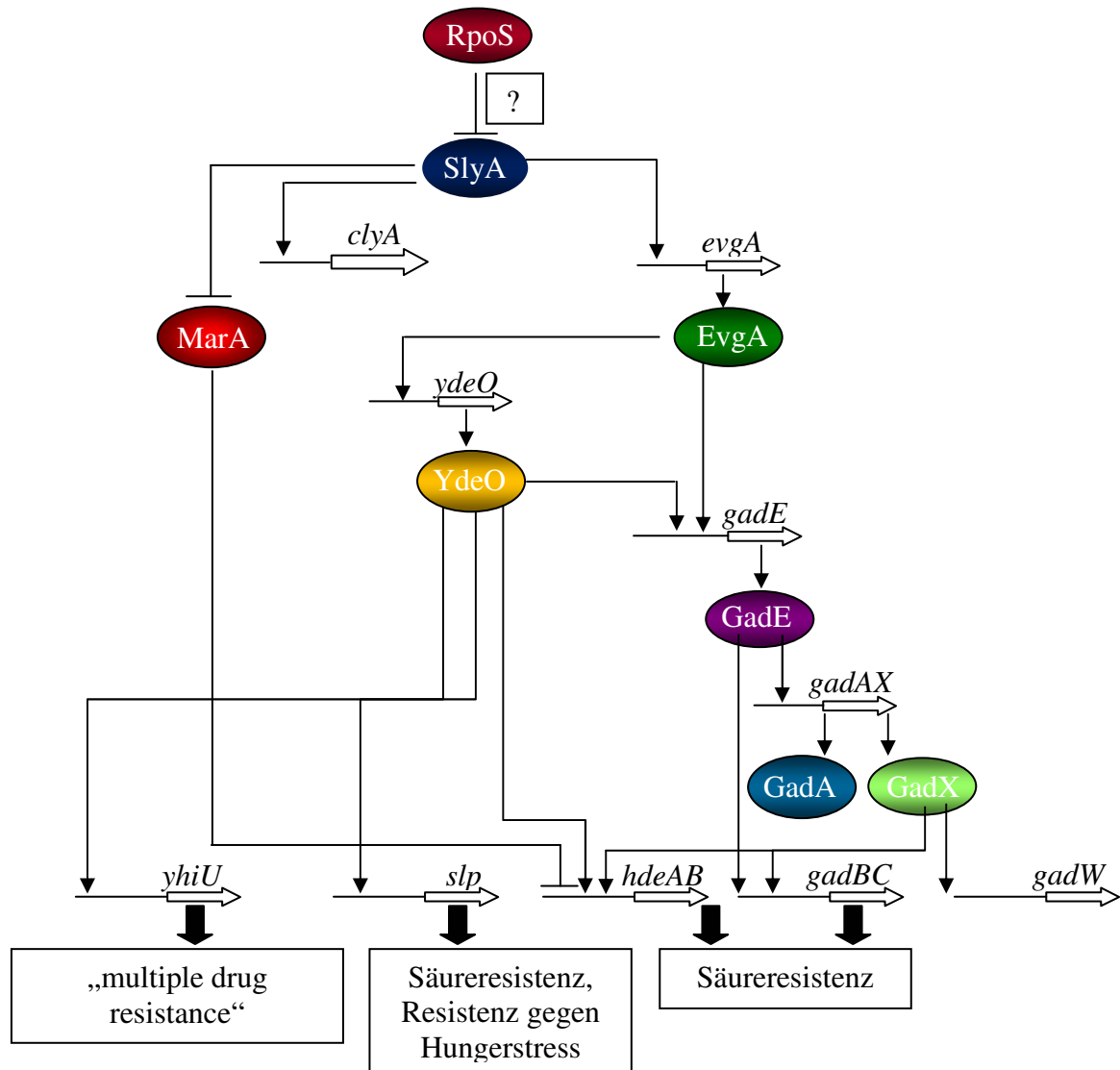
Durch die Transkriptomanalyse in *E. coli* K-12 sowie die Proteomanalyse durch Spory *et al.*, (2002) wurde die Regulation der Säureresistenz als eine wichtige Funktion von SlyA identifiziert. Diese spielt beim Überleben und der Pathogenese der enterischen *E. coli* Stämme eine zentrale Rolle. Zwei der Säureresistenz (AR)-Systeme von *E. coli* werden den DNA-Chip-Analysen in dieser Arbeit zufolge durch SlyA positiv beeinflusst: Zum einen wurde die Expression des zum Arginin-abhängigen AR-System gehörenden Antiporters, *adiC*, durch SlyA induziert. Zum anderen wurde die Expression des *evgA*-Gens, das den gleichnamigen Regulator des Glutamat-abhängigen AR-Systems kodiert, ebenfalls durch SlyA positiv reguliert. Die Überexpression von *evgA* bewirkt die Induktion von 37 Genen, darunter *gadABC* und *hdeAB* und verleiht exponentiell wachsenden *E. coli* Zellen Säureresistenz (Masuda & Church, 2002). Die Expressionsanalyse einer *evgA*'-'*lacZ*-Fusion in *E. coli* K-12, EPEC und EIEC sowie den korrespondierenden *slyA*-Mutanten zeigte, dass die *evgA*-Expression in *E. coli* K-12 niedriger als in den pathogenen Stämmen ist, und dass die Deletion von *slyA* zu einer Reduktion der *evgA*-Expression führt, während die *slyA*-Überexpression die *evgA*-Expression induziert. Somit konnte belegt werden, dass SlyA ein

Aktivator von *evgA* ist. Durch Gelretardationsexperimente wurde anhand der Ausbildung von hochmolekularen SlyA-DNA-Komplexen gezeigt, dass das SlyA-Protein direkt und spezifisch mit zwei Sequenzen der regulatorischen *evgA*-Region interagiert. Da mehrere hochmolekulare Komplexe mit zunehmender SlyA-Konzentration gebildet wurden, wird angenommen, dass mehrere SlyA-Moleküle evtl. kooperativ an den *evgA*-Promotor binden.

Durch die Deletion von *slyA* in EHEC EDL933 wurde darüber hinaus die Transkription des Gens *gadX* erhöht. GadX kodiert einen Transkriptionsaktivator, der u. a. das *hdeAB-yhiD* Operon und *hdeD* aktiviert, Gene, die in die Säureresistenz involviert sind und durch die Transkriptom-Analyse als SlyA-induziert detektiert wurden. Die Expression von *gadX* selbst wird durch GadE (Hommais, 2004) aktiviert und durch H-NS (Giangrossi, 2005), GadW, Fnr (Constantin, 2006) und RutR (Shimada, 2007) reprimiert. *hdeAB-yhiD* wird außerdem von MarA (Schneiders *et al.*, 2004) und H-NS (Shin *et al.*, 2005) reprimiert. Da *marA* von SlyA reprimiert wird und SlyA vermutlich als De-Repressor von H-NS wirkt, ist so auch eine indirekte Induktion des *hdeAB-yhiD* Operons durch SlyA denkbar.

Die Expression von weiteren EvgA-abhängigen Säurestressgenen, wie z.B. *gadA* wurde jedoch durch die Transkriptomanalyse nicht detektiert. Daher wurde die SlyA-Abhängigkeit einer *gadA-lacZ*-Reporter-gen-Fusion exemplarisch in verschiedenen *E. coli* Stämmen untersucht. In *E. coli* K-12, EIEC und EPEC wurde die aktivierende Wirkung von SlyA auf die *gadA*-Transkription eindeutig nachgewiesen, besonders drastisch war der Effekt in EIEC 12860. In Gelretardationsexperimenten konnte jedoch keine Bindung von SlyA an die DNA im Promotorbereich des *gadA*-Gens festgestellt werden. Somit erfolgt die SlyA-vermittelte Aktivierung der *gadA*-Transkription wahrscheinlich indirekt über die Aktivierung des übergeordneten Regulators EvgA.





**Abb. 4.3:** Das regulatorische SlyA-Netzwerk in *E. coli*

SlyA reguliert die Expression von Virulenzfaktoren wie dem Hämolysinen *clyA* und *evgA*, das den Response-Regulator des Zweikomponenten-Systems EvgA/S kodiert. EvgA induziert die Glutamat-abhängige Säureresistenz, Resistenz gegen Hungerstress und die „multiple drug resistance“ in *E. coli*. Die *slyA*-Expression wird vermutlich durch den alternativen Sigmafaktor RpoS indirekt reprimiert.

#### 4.5 Der Einfluss von SlyA auf Motilität und Morphologie von *E. coli*

Flagellen und Motilität spielen eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Adaptation an Umweltbedingungen und wurden oft mit der Virulenz verschiedener Pathogene assoziiert (Ottemann & Miller, 1997). Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergaben, dass SlyA die Flagellensynthese von *E. coli* Stämmen beeinflusst. So erwies sich der in dieser Studie verwendete EPEC Stamm JPN15 als nicht motil auf Trypton-Weichagar-Platten, elektronenmikroskopische Untersuchungen verdeutlichten jedoch, dass Flagellen auf der Oberfläche der Zellen exprimiert wurden. Amotile, jedoch flagellierte EPEC-Stämme sind in der Literatur bereits beschrieben worden (Chen & Rosenshine, 2003). Parallel dazu wurde gezeigt, dass EPEC unter Bedingungen, bei denen der LEE Lokus optimal exprimiert wird (Wachstum bis zur mittleren exponentiellen Phase in DMEM-Medium bei 37°C) (Rosenhine *et al.*, 1996) gewöhnlich nicht motil sind und keine Flagellen exprimieren. Die Repression der Flagellen-Expression in EPEC involviert die Stilllegung des *flhDC* Operons durch den globalen Regulator „Integration Host Factor“ (IHF) (Yona-Nadler *et al.*, 2003). Der biologische Sinn in der Flagellen-Repression in EPEC könnte in der Reduktion der Immunantwort durch die Senkung des Flagellin-Spiegels liegen (Hayashi *et al.*, 2001).

Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte *slyA*-defiziente EPEC Stamm erwies sich ebenfalls als nicht motil, er war durch die *slyA*-Mutation morphologisch unverändert und produzierte Flagellen in gleicher Weise wie der Wildtyp. Die Überexpression von *slyA* führte allerdings zur Ausbildung stark verlängerter Flagellen in größerer Zahl. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Deletion von *hosA*, einem Homolog von *slyA*, zu einer Reduktion der Flagellin-Produktion in EPEC führt (Ferrándiz *et al.*, 2005), so dass sich HosA und SlyA positiv auf die Flagellen-Produktion in EPEC auszuwirken scheinen.

Der in der vorliegenden Studie untersuchte EIEC Stamm 12860 zeigte ebenfalls keine Schwärmaktivität auf Trypton-Weichagar-Platten. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung offenbarte dessen ungeachtet die Expression von bis zu 5 Flagellen auf der Zelloberfläche. Eine *slyA*-defiziente Variante des Stammes produzierte keine Flagellen und formte sphärische, dickliche und kürzere Zellen als der Wildtyp.

Auch frühere Studien belegen, dass EIEC Stämme wie ihr naher Verwandter *Shigella* gewöhnlich nicht motil sind (Silva *et al.*, 1980): Mit Ausnahme des Serotyps O124:H30 zeigen sie in Standard-Motilitäts-Assays keine Motilität und produzieren typischerweise auch kein detektierbares Flagellen-Antigen. In 27 H<sup>-</sup> EIEC Stämmen unterschiedlicher Serotypen konnte jedoch nach Anzucht auf McConkey Agar die Produktion von Flagellen in unterschiedlichem Ausmaß nachgewiesen werden (Andrade *et al.*, 2002). Die Anzahl der

exprimierten Flagellen variierte dabei zwischen den Stämmen und Serotypen. Generell wurden bei einem Großteil der Population ein bis fünf Flagellenfilamente beobachtet (Andrade *et al.*, 2002). Es ist nicht bekannt, welche biologische Relevanz die Produktion von Flagellen für EIEC oder *Shigella* spp. besitzt.

Interessanterweise scheint die Flagellenregulation in EHEC ganz anders als in den anderen getesteten pathogenen *E. coli* Stämmen zu erfolgen. In der vorliegenden Arbeit konnte durch Transkriptomanalysen und Motilitätstests gezeigt werden, dass SlyA einen starken Effekt auf die Motilität von EHEC EDL933 hat: SlyA reprimiert in diesem Stamm die Transkription des *fliA*-Gens, dessen Genprodukt, der alternative Sigmafaktor  $\sigma^{28}$ , ein essentieller positiver Regulator des Flagellenregulons ist. Eine *slyA*-Überexpression unterdrückte das Schwärmvermögen dieses Stammes vollständig, während die Deletion von *slyA* zu Hypermotilität führte. Die Transkriptomanalysen offenbarten weiterhin, dass SlyA in EHEC auch die Fimbriensynthese und Adhäsion reguliert: die fimbrien-artigen Gene *ycbQ*, ECS4666 und ECS4665 und vor allem der wichtige Adhäsionsfaktor Intimin und sein translozierter Rezeptor Tir wurden durch *slyA*-Überexpression induziert.

Die Beziehung zwischen SlyA und der Motilität wurde bereits in *Salmonella* untersucht. In *S. enterica* war die Flagellin-Produktion in einer *slyA*-Mutante erniedrigt, was auf eine positive Regulation der Motilität durch SlyA in diesem Organismus schließen lässt (Spory *et al.*, 2002). In UPEC führte die Deletion von *slyA* im Gegensatz dazu zu einer erhöhten Flagellin Produktion (Simms & Mobley, 2008).

Motilität und Adhäsion tragen beide zur bakteriellen Fitness und Virulenz im Wirt bei. Die bakterielle Motilität wird durch das Flagellum vermittelt, die Bindung durch Fimbrien (Finlay & Falkow, 1997). Da beide Aktivitäten als gegeneinander gerichtete Kräfte wirken, ist das Bakterium zu einer strengen Regulation der Expression von Flagellen für die Motilität versus Fimbrien für die Adhärenz gezwungen. Eine hohe Fimbrienexpression bei einem schwimmenden Organismus würde die Motilität stören. Die entgegengesetzten Aktionen von Adhärenz und Motilität werden durch reziproke Regulation in Übereinstimmung gebracht (Ludwig, *et al.*, 1995; Lai, *et al.*, 2000).

Bisher wurden jedoch nur wenige regulatorische Netzwerke gefunden, die gleichzeitig die Fimbrienexpression steigern und die Flagellen-vermittelte Motilität verringern, oder anders herum. Dazu gehören das *bvgAS* System von *Bordetella* Spezies (Akerley *et al.*, 1995), zyklisches di-GMP (Simm *et al.*, 2004), die *fimZ*-Expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Clegg & Hughes, 2002) und das ToxR System in *Vibrio cholerae* (Gardel, Mekalanos, 1996). Das Gen *mrpJ* verringert bei Überexpression die Flagellen-vermittelte Motilität in *Proteus mirabilis* (Li *et al.*, 2001). In UPEC CFT073 führt die konstitutive

Expression von Typ 1 Fimbrien zu einer Repression der Motilität und Chemotaxis, so dass auch hier Motilität und Adhäsion koordiniert reguliert werden müssen (Bryan *et al.*, 2006; Lane *et al.*, 2007). Die Regulation erfolgt auf Transkriptionsebene: durch real time PCR konnte nachgewiesen werden, dass die konstitutive Expression der Typ I Fimbrien zu einer Erniedrigung der Transkription des *fliC*-Gens führt, dessen Genprodukt die Haupt-Flagellin Untereinheit bildet. Die Repression der Motilität in der Typ I Fimbrien konstitutiv exprimierenden CFT073 Variante geht aber nicht allein auf die Fimbrien Expression zurück. Mehrere weitere Faktoren spielen bei der Regulation der Motilität durch die Typ I Fimbrien eine Rolle, darunter ist auch SlyA (Simms & Mobley, 2008).

Das Histon-ähnliche Protein H-NS ist ein positiver Regulator der Flagellen Expression in *E. coli* und dessen Deletion führt zu einem nicht motilen Phänotyp. Da SlyA und H-NS am *clyA* Promotor um die Bindung kompetitieren (Westermarck *et al.*, 2000), ist es denkbar, dass SlyA in UPEC mit H-NS um die Bindestellen am *flhDC* Promotor kompetitiert. Bisher ist jedoch noch unklar, ob SlyA die Expression der Typ I Fimbrien in UPEC direkt reguliert, oder ob die Regulation durch den Antagonismus zu H-NS vermittelt wird.

SlyA könnte also in den pathogenen *E. coli* Stämmen EHEC EDL933 und UPEC CFT073 einen wichtigen Regulator darstellen, der die Adhärenz und Motilität gegensätzlich steuert, indem er einerseits durch Hemmung der Flagellensynthese über die Kontrolle von *fliA* die Motilität reprimiert und andererseits die Fimbriensynthese und Adhäsion aktiviert.

## 5. Zusammenfassung

Zur Gattung *Escherichia coli*, dem prominentesten Vertreter der Enterobacteriaceen, gehören sowohl fakultativ als auch obligat pathogene Arten, die unterschiedlichste Krankheiten auslösen können. Diese sind typischerweise mit spezifischen Virulenzfaktoren assoziiert. Zu letzteren gehört das porenbildende Cytolysin ClyA, dessen Gen-Expression in *E. coli* K-12 Stämmen reprimiert (kryptisch) ist. Im Verlauf dieser Arbeit wurde jedoch nachgewiesen, dass dies nicht für pathogene Vertreter der Spezies wie EPEC, EIEC und EHEC zutrifft. Eingehende Analysen konnten die stärkere Expression des *clyA*-Gens in Vertretern dieser Virotypen mit einer erhöhten Synthese des globalen Transkriptionsfaktors SlyA in Verbindung bringen. Das SlyA-Protein aus *E. coli* K-12 zeigte jedoch die gleiche Funktionalität und Stabilität gegenüber gängigen Proteasen wie die SlyA-Proteine aus den pathogenen Stämmen. Dagegen konnte eine höhere Aktivität des *slyA*-Promotors und somit erhöhte SlyA-Proteinmenge in den pathogenen Stämmen als Ursache der *clyA*-Induktion festgestellt werden. Für die Repression der *slyA*-Expression zeigte sich der alternative Sigma-Faktor RpoS verantwortlich, einer der Hauptregulatoren der generellen Stressantwort in *E. coli*. Seine Deletion führte zu einem signifikanten Anstieg der *slyA*-Expression und – Synthese. Eine Untersuchung von neun pathogenen und vier apathogenen Vertretern offenbarte eine sehr heterogene Ausprägung des RpoS-Levels in *E. coli*. Generell wurde in pathogenen Stämmen wenig oder kein funktionelles RpoS detektiert, in apathogenen Stämmen jedoch deutlich höhere RpoS-Level detektiert.

Ein zweiter Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Analyse der Promotorregion und Autoregulation von SlyA. Ein dominanter Transkriptions-Initiationspunkt wurde 48 Nukleotide stromaufwärts des Startcodons TTG lokalisiert. In EIEC, EPEC und *E. coli* K-12 unterlag die *slyA*-Expression einem positiv-autoregulatorischen Mechanismus. Es wurden fünf palindromartige Bindestellen mit unterschiedlicher Affinität für SlyA und unterschiedlicher regulatorischer Wirkung im Promotor von *slyA* detektiert, die alle das Kernmotiv AGCA beinhalten. Während die am weitesten stromaufwärts lokalisierte Bindestelle die SlyA-Autoregulation positiv beeinflusste, reprimierte die nahe dem Transkriptionsstart gelegene Bindestelle die Autoregulation geringfügig.

Ein dritter Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Mikroarray-basierten Analyse des SlyA-Regulons in *E. coli* K-12 und EHEC, welche sich stark unterschieden. Die meisten SlyA-abhängigen Gene in *E. coli* K-12 sind in Stoffwechselprozesse sowie Regulationsprozesse und Stressresistenz involviert oder kodieren ribosomale Proteine. So wurde z. B. die Expression des *evgA*-Gens induziert, das einen wichtigen Aktivator des glutamatabhängigen Säureresistenz-Systems kodiert, zu dem auch die Säurestressgene *hdeA,B* und *gadA* gehören. Der Promotor des *evgA*-Gens wird direkt und spezifisch von SlyA gebunden und in *E. coli* K-12, wie auch EIEC und EPEC durch SlyA induziert: im Wildtyp lag die Expression in

MC4100 2,8fach, in EIEC 12860 3,2fach und in EPEC JPN15 9,5fach höher als in der *slyA*-Mutante.

In EHEC wurde mit *gadX* ebenfalls ein positiver Regulator der Glutamat-abhängigen Säureresistenz als *SlyA*-induziert detektiert. Abgesehen davon wurden zumeist *SlyA*-abhängige Gene detektiert, die Aufgaben in Sekretions- und Regulationsprozessen wahrnehmen. Auch wurden Effektor- und Virulenzgene identifiziert, die kein Äquivalent in *E. coli* K-12 haben sowie Adhäsions- und Motilitätsfaktoren, wie z. B. *fliA*, ein essentieller Aktivator der Flagellen-Synthese, dessen Expression von *SlyA* durch direkte Bindung an die regulatorische Region reprimiert wird. Eine EHEC *slyA*-Mutante war demgemäß gegenüber dem Wildtyp hypermotil, während eine Überexpression die Motilität vollständig unterdrückte. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass die *SlyA*-Regulation sehr komplex ist und große Unterschiede im Vergleich zu den homologen Proteinen in verwandten Arten bestehen. Sogar innerhalb der Spezies *E. coli* unterscheiden sich die *SlyA*-Netzwerke grundlegend. Generell scheint *SlyA* jedoch ein wichtiger Virulenzfaktor in den pathogenen *E. coli* Stämmen zu sein, der den Bakterien unter bestimmten Umweltbedingungen einen Wachstumsvorteil verschafft, indem er durch den globalen  $\sigma$ -Faktor RpoS kontrolliert wird.

## 6. Summary

Both facultative and obligatory pathogens are genera of *Escherichia coli*, the most significant representative of the family of *Enterobacteriaceae*. These diverse types are responsible for causing the most different diseases. Typically, the species are associated with specific virulence factors. Such a virulence factor, for example, is the pore-forming Cytolysin ClyA, whose gene expression is repressed (cryptic) in *E. coli* K-12 strains. Within the scope of this doctoral thesis, however, it was demonstrated that this fact does not apply to pathogenic representatives of the species, such as EPEC, EIEC and EHEC. By means of more profound analyses, the stronger expression of the *clyA* gene found in representatives of this virotypes could be associated with an increased synthesis of the global transcription factor SlyA. However, the SlyA protein from *E. coli* K-12 showed the same functionality and stability towards current proteases as SlyA proteins from pathogenic strains. Nevertheless, a higher activity of the *slyA* promoter and, thus, an increased amount of SlyA in pathogenic strains could be detected, which was the cause for the *clyA* induction. It turned out that the alternative sigma factor RpoS was responsible for the repression of the *slyA* expression. This factor is one of the master regulators of the general stress response in *E. coli*. Its deletion led to a significant increase in *slyA* expression and synthesis. When analyzing nine pathogenic and four apathogenic representatives, a highly heterogeneous RpoS level in *E. coli* was detected. Generally, only little or no functional RpoS was detected in pathogenic strains; in apathogenic strains, however, a significantly higher RpoS level was found.

The second main focus of the present doctoral thesis was the analysis of the promoter region and the autoregulation of SlyA. A dominant transcription initiation point was localized 48 nucleotides upstream of the initiation codon TTG. In EIEC, EPEC and *E. coli* K-12 the *slyA* expression was liable to a positive autoregulatory mechanism. Five palindromic binding sequences with a different affinity for SlyA and a different regulatory effect were detected in the *slyA* promoter. All of the sequences include the core motif AGCA. While the most upstream binding position positively influenced the SlyA autoregulation, the binding position close to the transcription initiation point slightly repressed the autoregulation.

The third main focus of the thesis was the microarray-based analysis of the SlyA regulon in *E. coli* K-12 and EHEC, which strongly differed from each other. Most of the SlyA-dependent genes in *E. coli* K-12 were involved in metabolism processes as well as in regulatory processes and stress resistance or code for ribosomal proteins. Thus, for example, the expression of the *evgA* gene was induced; this gene encodes an important activator of the glutamate-dependent acid-resistance system to which also belong the acid stress genes *hdeAB* and *gadA*. The promoter of the *evgA* gene is directly and specifically bound and induced by SlyA in *E. coli* K-12, EIEC and EPEC: In the wild type of MC4100, the expression

was 2.8-fold higher, in EIEC 12860 3.2-fold higher and in EPEC JPN15 9.5-fold higher than in the *slyA* mutant.

By means of *gadX* it was found out that also in EHEC a positive regulator of the glutamate-dependent acid resistance was induced by SlyA. Apart from that, mostly SlyA-dependent genes carrying out activities in secretion processes and regulation were observed. Moreover, effector and virulence genes with no equivalent in *E.coli* K-12 as well as adhesion and motility factors, such as *fliA*, were found. FliA is an essential activator of the flagella synthesis, whose expression is repressed by SlyA by direct binding to the regulatory region. For this reason, an EHEC *slyA* mutant was hypermotile towards the wild type, whereas an overexpression completely suppressed motility.

The results of this work demonstrate that the SlyA regulation is very complex and that there are great differences compared to the homologous proteins in related species. Even within the species of *E. coli*, the SlyA networks fundamentally differ from each other.

However, SlyA seems to be an important virulence factor in the pathogenic *E.coli* strains. It promotes the growth of bacteria under certain environmental conditions via being controlled by the global sigma factor RpoS.



## 7. Literatur

Afflerbach H, Schroder O & Wagner R (1999) Conformational changes of the upstream DNA mediated by H-NS and FIS regulate *E. coli* RnB P1 promoter activity. *J Mol Biol* **286**:339-353.

Akerley BJ, Cotter PA & Miller JF (1995) Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the *Bordetella*-host interaction. *Cell* **80**:611-620.

Aldridge P & Hughes KT (2002) Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol* **5**(2):160-5.

Alekshun MM & Levy SB (1999) Alteration of the repressor activity of MarR, the negative regulator of the *Escherichia coli* marRAB locus, by multiple chemicals in vitro. *J Bacteriol* **181**:4669-4672.

Alekshun MM, Levy SB, Mealy TR, Seaton BA & Head JF (2001) The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution. *Nat Struct Biol* **8**:710-714.

Alpuche Aranda CM, Swanson JA, Loomis WP & Miller SI (1992) Salmonella typhimurium activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10079–10083.

Andrade A, Giron JA, Amhaz JM, Trabulsi LR & Martinez MB (2002) Expression and characterization of flagella in nonmotile enteroinvasive *Escherichia coli* isolated from diarrhea cases. *Infect Immun* **70**:5882-5886.

Apel D & Surette MG (2008) Bringing order to a complex molecular machine: the assembly of the bacterial flagella. *Biochim Biophys Acta* **1778**(9):1851-8.

Atlung T & Ingmer H (1997) H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol Microbiol* **24**:7-17.

Audia JP, Webb CC & Foster JW (2001) Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *Int J Med Microbiol* **291**:97-106.

Badaut C, Williams R, Arluisson V, Bouffartigues E, Robert B, Buc H & Rimsky S (2002) The degree of oligomerization of the H-NS nucleoid structuring protein is related to specific binding to DNA. *J Biol Chem* **277**:41657-41666.

Bader MW, Sanowar S, Daley ME, Schneider AR, Cho U, *et al.* (2005) Recognition of Antimicrobial Peptides by a Bacterial Sensor Kinase. *Cell* **122**:461-472.

Baldwin TJ (1998) The 18th C.L. Oakley Lecture. Pathogenicity of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* **47**:283-293.

Barembuch C, Hengge R (2007) Cellular levels and activity of the flagellar sigma factor FlhA of *Escherichia coli* are controlled by FlgM-modulated proteolysis. *Mol Microbiol*. Jul;65(1):76-89. Epub 2007 May 30.

Barth M, Marschall C, Muffler A, Fischer D & Hengge-Aronis R (1995) Role for the histone-like protein H-NS in growth phase-dependent and osmotic regulation of sigma S and many sigma S-dependent genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**:3455-3464.

- Bartlett DH, Frantz BB & Matsumura P (1988) Flagellar transcriptional activators FlbB and Flal: gene sequences and 5' consensus sequences of operons under FlbB and Flal control. *J Bacteriol* **170**(4):1575-81.
- Bearson BL, Wilson L & Foster JW (1998) A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. *J Bacteriol* **180**:2409-2417.
- Beier D & Gross R (2006) Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Current Opinion in Microbiology* 9: 143–152.
- Belden WJ & Miller SI (1994) Further characterization of the PhoP regulon: identification of new PhoP-activated virulence loci. *Infect Immun* **62**:5095-5101.
- Benenson AS (ed.). (1995). Control of Communicable Diseases Manual, Sixteenth Edition. United Book Press, Baltimore, pp. 140-150.
- Bianchi AA & Baneyx F (1999) Hyperosmotic shock induces the sigma32 and sigmaE stress regulons of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **34**:1029-1038.
- Bishop RE, Penfold SS, Frost LS, Høltje JV & Weiner JH (1995) Stationary phase expression of a novel *Escherichia coli* outer membrane lipoprotein and its relationship with mammalian apolipoprotein D. Implications for the origin of lipocalins. *J Biol Chem* **270**(39):23097-103.
- Bishop Re, Leskiw BK, Hodges RS, Kay CM & Weiner JH (1998) The entericidin locus of *Escherichia coli* and its implications for programmed bacterial cell death. *J. Mol. Biol.* **280**:583-596.
- Black RE (1990) Epidemiology of travelers' diarrhea and relative importance of various pathogens. *Rev Infect Dis* **12 Suppl 1**:73-79.
- Blanco J, Blanco M, Garabal JI & Gonzalez EA (1991) Enterotoxins, colonization factors and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* from humans and animals. *Microbiologia* **7**:57-73.
- Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, González EA, Bernárdez MI & Blanco J (2004) Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae*ξ). *J. Clin. Microbiol* **42**:645-651.
- Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-74.
- Blot N, Mavathur R, Geertz M, Travers A, Muskhelishvili G (2006) Homeostatic regulation of supercoiling sensitivity coordinates transcription of the bacterial genome. *EMBO Rep* **7**:710-715.
- Blumer C, Kleefeld A, Lehnen D, *et al.* (2005) Regulation of type 1 fimbriae synthesis and biofilm formation by the transcriptional regulator LrhA of *Escherichia coli*. *Microbiology* **151**:3287-3298.
- Bockemühl J, Karch H & Tschäpe H (1997) Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland 1996. *Bundesgesundheitsbl*, **40**:194-197.

- Bockemühl J, Karch H & Tschäpe H (1998) Zur Situation der Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland 1997. Bundesgesundhbl. 41/Sonderheft: 2–5.
- Bolivar F, Rodriguez RL, Green PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH & Falkow S (1977) Gene 2, 95–113.
- Bongaerts J, Zoske S, Weidner U & Uden G (1995) Transcriptional regulation of the proton translocating NADH dehydrogenase genes (nuoA-N) of *Escherichia coli* by electron acceptors, electron donors and gene regulators. *Mol Microbiol* **16**:521-534.
- Bordi C, Théraulaz L, Méjean V & Jourlin-Castelli C (2003) Anticipating an alkaline stress through the Tor phosphorelay system in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **48**(1):211-23.
- Bouffartigues E, Buckle M, Badaut C, Travers A & Rimsky S (2007) H-NS cooperative binding to high-affinity sites in a regulatory element results in transcriptional silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol* **14**:441-448.
- Brescia CC, Kaw MK & Sledjeski DD (2004) The DNA binding protein H-NS binds to and alters the stability of RNA *in vitro* and *in vivo*. *J Mol Biol* **339**:505-514.
- Brodsky IE, Ernst RK, Miller SI & Falkow S (2002) mig-14 is a *Salmonella* gene that plays a role in bacterial resistance to antimicrobial peptides. *J Bacteriol* **184**:3203-3213.
- Brodsky IE & Gunn JS (2005) A bacterial sensory system that activates resistance to innate immune defenses: potential targets for antimicrobial therapeutics. *Mol Interv* **5**: 335–337.
- Browning DF, Cole JA & Busby SJ (2000) Suppression of Fnr-dependent transcription activation at the *Escherichia coli* nir promoter by Fis, IHF and H-NS: modulation of transcription initiation by a complex nucleo-protein assembly. *Mol Microbiol* **37**(5):1258-69.
- Browning DF, Cole JA & Busby SJ (2004) Transcription activation by remodelling of a nucleoprotein assembly: the role of NarL at the Fnr-dependent *Escherichia coli* nir promoter. *Mol Microbiol* **53**(1):203-15.
- Brumell JH, Kujat-Choy S, Brown NF, Vallance BA, Knodler LA & Finlay BB (2003) SopD2 is a novel type III secreted effector of *Salmonella typhimurium* that targets late endocytic compartments upon delivery into host cells. *Traffic* **4**:36-48.
- Bryan A, Roesch P, Davis L, Moritz R, Pellett S & Welch RA (2006) Regulation of type 1 fimbriae by unlinked FimB- and FimE-like recombinases in uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073. *Infect Immun* **74**:1072-1083.
- Buchmeier N, Bossie S, Chen CY, Fang FC, Guiney DG & Libby SJ (1997) SlyA, a transcriptional regulator of *Salmonella typhimurium*, is required for resistance to oxidative stress and is expressed in the intracellular environment of macrophages. *Infect Immun*. **65**:3725-3730.
- Bustamante V, Santana FJ, Calva E & Puente JL (2001) Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol Microbiol* **39**:664-678.
- Butler SM, Festa RA, Pearce MJ & Darwin KH (2006) Self-compartmentalized bacterial proteases and pathogenesis. *Mol Microbiol* **60**:553-562.

Campellone KG, Robbins D & Leong JM (2004) EspFU is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly. *Dev Cell* **7**: 217-228.

Campellone KG, Rankin S, Pawson T, Kirschner MW, Tipper DJ & Leong JM (2004) Clustering of Nck by a 12-residue Tir phosphopeptide is sufficient to trigger localized actin assembly. *J Cell Biol* **164**:407-416.

Campellone KG & Leong JM (2003) Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Curr Opin Microbiol.* **6**(1):82-90.

Campos LC, Franzollin MR & Trabulsi LR (2004) Diarrheagenic *Escherichia coli* Categories among the Traditional Enteropathogenic *E. coli* O Serogroups *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**(6):545-52.

Casadaban MJ (1976) Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* **104**:541-555.

Castanie-Cornet MP, Penfound TA, Smith D, Elliott JF & Foster JW (1999) Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**:3525-3535.

Cathelyn JS, Crosby SD, Lathem WW, Goldman WE & Miller VL (2006) RovA, a global regulator of *Yersinia pestis*, specifically required for bubonic plague. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:13514-13519.

Cathelyn JS, Ellison DW, Hinchliffe SJ, Wren BW & Miller VL (2007) The RovA regulons of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis* are distinct: evidence that many RovA-regulated genes were acquired more recently than the core genome. *Mol Microbiol* **66**(1):189-205.

Celli J, Deng W, Finlay BB (2000) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cell Microbiol.* **2**(1):1-9.

Ceschini S, Lupidi G, Coletta M, Pon CL, Fioretti E & Angeletti M (2000) Multimeric self-assembly equilibria involving the histone-like protein H-NS. A thermodynamic study. *J Biol Chem* **275**:729-734.

Chang AC & Cohen SN (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* **134**:1141-1156.

Chao AC, de Sauvage FJ, Dong YJ, Wagner JA, Goeddel DV & Gardner P (1994) Activation of intestinal CFTR Cl<sup>-</sup> channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. *Embo J* **13**:1065-1072.

Chen HD & Frankel G (2005) Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 83–98.

Chevance FF & Hughes KT (2008) Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Microbiol* **6**(6):455-65.

Chilcott GS & Hughes KT (2000) Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 694-708.

Cleary J, Lai LC, Shaw RK, Straatman-Iwanowska A, Donnenberg MS, Frankel G & Knutton S (2004) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* **150**(Pt 3):527-38.

Clegg S & Hughes KT (2002) FimZ is a molecular link between sticking and swimming in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **184**:1209-1213.

Constantinidou C, Hobman JL, Griffiths L, Patel MD, Penn CW, Cole JA & Overton TW (2006) A reassessment of the Fnr regulon and transcriptomic analysis of the effects of nitrate, nitrite, NarXL, and NarQP as *Escherichia coli* K-12 adapts from aerobic to anaerobic growth. *J Biol Chem* **281**:4802-15.

Coldewey SM, Hartmann M, Schmidt DS, Engelking U, Ukena SN & Gunzer F (2007) Impact of the rpoS genotype for acid resistance patterns of pathogenic and probiotic *Escherichia coli* *BMC Microbiology* **7**:21.

Corbett D, Bennett HJ, Askar H, Green J & Roberts IS (2007) SlyA and H-NS regulate transcription of the *Escherichia coli* K5 capsule gene cluster and expression of slyA in *Escherichia coli* is temperature dependent, positively autoregulated and independent of H-NS. *J Biol Chem* **282**:33326-33335.

Cornelis GR (1993) Role of the transcription activator virF and the histone-like protein YmoA in the thermoregulation of virulence functions in yersiniae. *Zentralbl Bakteriologie* **278**:149-164.

Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM & Rowe B (1979) An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Current Microbiology* **3**:95-9.

Cravioto A, Trujillo F, León LA, Hernández JM, Eslava C (1996) Infections caused by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Gac Med Mex*. **132**(6):611-5.

Dame RT, Wyman C & Goosen N (2001) Structural basis for preferential binding of H-NS to curved DNA. *Biochimie* **83**:231-234.

Dame RT, Wyman C, Wurm R, Wagner R & Goosen N (2002) Structural basis for H-NS-mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at the rrnB P1. *J Biol Chem* **277**:2146-2150.

Dame RT, Luijsterburg MS, Krin E, Bertin PN, Wagner R & Wuite GJ (2005) DNA bridging: a property shared among H-NS-like proteins. *J Bacteriol* **187**:1845-1848.

Dame RT, Noom MC & Wuite GJ (2006) Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation. *Nature* **444**:387-390.

Daniels JJ, Autenrieth IB, Ludwig A & Goebel W (1996) The gene slyA of *Salmonella typhimurium* is required for destruction of M cells and intracellular survival but not for invasion or colonization of the murine small intestine. *Infect Immun* **64**:5075-5084.

Darwin AJ, Tyson KL, Busby SJ & Stewart V (1997) Differential regulation by the homologous response regulators NarL and NarP of *Escherichia coli* K-12 depends on DNA binding site arrangement. *Mol Microbiol* **25**(3):583-95.

Datsenko KA & Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6640-5.

- De Biase D, Tramonti A, Bossa F & Visca P (1999) The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. *Mol. Microbiol* **32**:1198-1211.
- Deghmane AE, Petit S, Topilko A, Pereira Y, Giorgini D, Larribe M & Taha MK (2000) Intimate adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells is under the control of the *crgA* gene, a novel LysR-type transcriptional regulator. *Embo J* **19**:1068-1078.
- Deibel C, Kramer S, Chakraborty T & Ebel F (1998) EspE, a novel secreted protein of attaching and effacing bacteria, is directly translocated into infected host cells, where it appears as a tyrosine-phosphorylated 90 kDa protein. *Mol Microbiol* **28**:463-474.
- del Castillo FJ, Leal SC, Moreno F & del Castillo I (1997) The *Escherichia coli* K-12 *sheA* gene encodes a 34-kDa secreted haemolysin. *Mol. Microbiol.* **25**:107-115.
- del Castillo FJ, Moreno F & del Castillo I (2000) Characterization of the genes encoding the SheA haemolysin in *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella flexneri* 2a. *Res Microbiol* **151**:229-230.
- Derbise A, Lesic B, Dacheux D, Ghigo JM & Carniel E (2003) A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **38**:113–116.
- Dersch P, Schmidt K & Bremer E (1993) Synthesis of the *Escherichia coli* K-12 nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is subjected to growth-phase control and autoregulation. *Mol Microbiol* **8**:875-889.
- De Silva RS, Kovacicova G, Lin W, Taylor RK, Skorupski K & Kull FJ (2005) Crystal structure of the virulence gene activator AphA from *Vibrio cholerae* reveals it is a novel member of the winged helix transcription factor superfamily. *J Biol Chem* **280**:13779-13783.
- Detweiler CS, Monack DM, Brodsky IE, Mathew H & Falkow S (2003) *virK*, *somA* and *rscC* are important for systemic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection and cationic peptide resistance. *Mol Microbiol* **48**:385-400.
- De Wulf P, McGuire AM, Liu X & Lin EC (2002) Genome-wide profiling of promoter recognition by the two-component response regulator CpxR-P in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**(29):26652-61.
- Dong T & Schellhorn HE (2009) Global effect of RpoS on gene expression in pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *BMC Genomics* **10**(1):349.
- Donnenberg MS & Nataro JP (1995) Methods for studying adhesion of diarrheagenic *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **253**:324-336.
- Donnenberg MS, Yu J & Kaper JB (1993) A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *J Bacteriol* **175**: 4670-4680.
- Donnenberg MS, Giron JA, Nataro JP & Kaper JB (1992) A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol Microbiol* **6**:3427-3437.
- Donnenberg MS, Tzipori S, McKee ML, O'Brien AD, Alroy J & Kaper JB (1993) The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *J Clin Invest* **92**:1418-1424.

- Donnenberg MS, Tacket CO, James SP, *et al.* (1993) Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J Clin Invest* **92**:1412-1417.
- Dorman CJ (2004) H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol* **2**:391-400.
- Dorman CJ (2007a) Probing bacterial nucleoid structure with optical tweezers. *Bioassays* **29**:212-216.
- Dorman CJ (2007b) H-NS, the genome sentinel. *Nat Rev Microbiol* **5**:157-161.
- Dorman CJ, Hinton JC & Free A (1999) Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid-associated proteins in bacteria. *Trends Microbiol* **7**:124-128.
- DuPont HL, Formal SB, Hornick RB, *et al.* (1971) Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *N Engl J Med* **285**:1-9.
- Dutta R, Qin L & Inouye M (1999) Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol. Microbiol* **34**:633-640.
- Eguchi Y, Oshima T, Mori H, Aono R, Yamamoto K, Ishihama A & Utsumi R (2003) Transcriptional regulation of drug efflux genes by EvgAS, a two-component system in *Escherichia coli*. *Microbiology* **149**:2819-2828.
- Eguchi Y, Okada T, Minagawa S, Oshima T, Mori H, Yamamoto K, Ishihama A & Utsumi R (2004) Signal transduction cascade between EvgA/EvgS and PhoP/PhoQ two-component systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**:3006-3014.
- Eifler N, Vetsch M, Gregorini P, Ringler P, Chami M, Philippsen A, Fritz A, Müller SA, Glockshuber R, Engel A & Grauschopf U (2006) Cytotoxin ClyA from *Escherichia coli* assembles to a 13-meric pore independent of its redox-state. *EMBO J* **25**:2652-2661.
- Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK, *et al.* (1998) The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* **28**:1-4.
- Elliott SJ, Yu J & Kaper JB (1999) The cloned locus of enterocyte effacement from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is unable to confer the attaching and effacing phenotype upon *E. coli* K-12. *Infect Immun* **67**:4260-4263.
- Ellison DW, Lawrenz MB & Miller VL (2004) Invasin and beyond: regulation of *Yersinia* virulence by RovA. *Trends Microbiol* **12**(6):296-300.
- Ellison DW & Miller VL (2006) Regulation of virulence by members of the MarR/SlyA family. *Curr Opin Microbiol* **9**:153-159.
- Esposito D, Petrovic A, Harris R, *et al.* (2002) H-NS oligomerization domain structure reveals the mechanism for high order self-association of the intact protein. *J Mol Biol* **324**:841-850.
- Falconi M, Gualtieri MT, La Teana A, Losso MA & Pon CL (1988) Proteins from the prokaryotic nucleoid: primary and quaternary structure of the 15-kD *Escherichia coli* DNA binding protein H-NS. *Mol Microbiol* **2**:323-329.
- Falconi M, Higgins NP, Spurio R, Pon CL & Gualerzi CO (1993) Expression of the gene encoding the major bacterial nucleotide protein H-NS is subject to transcriptional auto-repression. *Mol Microbiol* **10**:273-282.

Falconi M, Colonna B, Prosseda G, Micheli G & Gualerzi CO (1998) Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of virF promoter to transcriptional repressor H-NS. *Embo J* **17**:7033-7043.

Fang FC, DeGroote MA, Foster JW, Bäumlér AJ, Ochsner U, Testerman T, Bearson S, Giard J-C, Xu Y, Campbell G & Laessig T (1999) Virulent *Salmonella typhimurium* has two periplasmic Cu,Zn-superoxide dismutases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:7502-7507.

Fang FC & Rimskey S (2008) New insights into transcriptional regulation by H-NS. *Curr Opin Microbiol* **11**(2):113-20.

Feng X, Walther D, Oropeza R & Kenney LJ (2004) The response regulator SsrB activates transcription and binds to a region overlapping OmpR binding sites at *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* **54**:823-835.

Ferrándiz MJ, Bishop K, Williams P & Withers H (2005) HosA, a member of the SlyA family, regulates motility in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun* **73**:1684-1694.

Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG & Heffron F (1986) Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:5189-5193.

Fields PI, Groisman EA & Heffron F (1989) A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science* **243**:1059-1062.

Filenko N, Spiro S, Browning DF, Squire D, Overton TW, Cole J & Constantinidou C (2007) The NsrR regulon of *Escherichia coli* K-12 includes genes encoding the hybrid cluster protein and the periplasmic, respiratory nitrite reductase. *J Bacteriol* **189**:4410-4417.

Finlay BB & Falkow S (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:136-169.

Foster JW & Hall HK (1990) Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **172**:771-778.

Frankel G, Lider O, HersHKoviz R, Mould AP, Kachalsky SG, Candy DC, Cahalon L, Humphries MJ & Dougan G (1996) The cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to beta1 integrins. *J Biol Chem* **271**:20359-20364.

Frankel G, Phillips AD, Trabulsi LR, Knutton S, Dougan G & Matthews S (2001) Intimin and the host cell—is it bound to end in Tir(s)? *Trends Microbiol* **9**:214-218.

Fredriksson A, Ballesteros M, Dukan S & Nystrom T (2005) Defense against protein carbonylation by DnaK/DnaJ and proteases of the heat shock regulon. *J Bacteriol* **187**:4207-4213.

Fu GK & Markovitz DM (1998) The human LON protease binds to mitochondrial promoters in a single-stranded, site-specific, strand-specific manner. *Biochemistry* **37**(7):1905-9.

Fu GK, Smith MJ & Markovitz DM (1997) Bacterial protease Lon is a site-specific DNA-binding protein. *J Biol Chem* **272**(1):534-8.



- Gaastra W & Svennerholm AM (1996) Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends Microbiol* **4**:444-452.
- Galan B, Kolb A, Sanz JM, Garcia JL & Prieto MA (2003) Molecular determinants of the hpa regulatory system of *Escherichia coli*: the HpaR repressor. *Nucleic Acids Res* **31**:6598-6609.
- Gallegos MT, Schleif R, Bairoch A, Hofmann K & Ramos JL (1997) Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:393-410.
- Garcia J, Madrid C, Juarez A & Pons M (2006) New roles for key residues in helices H1 and H2 of the *Escherichia coli* H-NS N-terminal domain: H-NS dimer stabilization and Hha binding. *J Mol Biol* **359**:679-689.
- Garcia Vescovi E, Soncini FC & Groisman EA (1996) Mg<sup>2+</sup> as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella virulence*. *Cell* **84**:165-174.
- Garcia Vescovi E, Ayala YM, Di Cera E & Groisman EA (1997) Characterization of the bacterial sensor protein PhoQ: evidence for distinct binding sites for Mg Mg<sup>2+</sup> and Ca Ca<sup>2+</sup>. *J Biol Chem* **272**:1440-1443.
- Gardel CL & Mekalanos JJ (1996) Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression. *Infect Immun* **64**:2246-2255.
- Garmendia J, Phillips AD, Carlier MF, *et al.* (2004) TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. *Cell Microbiol* **6**:1167-1183.
- Gascon J (2006) Epidemiology, etiology and pathophysiology of traveler's diarrhea. *Digestion* **73** Suppl 1:102-8.
- Gasser C, Gautier E, Steck A, Siebenmann RE & Oechslin R (1955) Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia. *Schweiz Med Wochenschr* **85**:905-909.
- George AM & Levy SB (1983) Gene in the major cotransduction gap of the *Escherichia coli* K-12 linkage map required for the expression of chromosomal resistance to tetracycline and other antibiotics. *J Bacteriol* **155**:541-548.
- Giannella RA, Mann EA (2003) *E. coli* heat-stable enterotoxin and guanylyl cyclase C: new functions and unsuspected actions. *Trans Am Clin Climatol Assoc* **114**:67-85.
- Giangrossi M, Zattoni S, Tramonti A, De Biase D & Falconi M (2005) Antagonistic role of H-NS and GadX in the regulation of the glutamate decarboxylase-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**:21498-21505.
- Gibson KE & Silhavy TJ (1999) The LysR homolog LrhA promotes RpoS degradation by modulating activity of the response regulator sprE. *J Bacteriol* **181**:563-571.
- Gillen KL & Hughes KT (1991) Molecular characterization of flgM, a gene encoding a negative regulator of flagellin synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **173**:6453-6459.
- Giron JA, Ho AS & Schoolnik GK (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**:710-713.

- Giron JA, Torres AG, Freer E & Kaper JB (2002) The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol Microbiol* **44**:361-379.
- Goldberg AL (1992) The mechanism and functions of ATP-dependent proteases in bacterial and animal cells. *Eur J Biochem.* **203**(1-2):9-23.
- Goldstein JL, Sahi J, Bhuvu M, Layden TJ & Rao MC (1994) *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin-mediated colonic Cl<sup>-</sup> secretion is absent in cystic fibrosis. *Gastroenterology* **107**:950-956.
- Gomez-Duarte OG & Kaper JB (1995) A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal eaeA expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**:1767-1776.
- Gong S, Richard H & Foster JW (2003) YjdE (AdiC) is the arginine:agmatine antiporter essential for arginine-dependent acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**:4402-4409.
- Goosney DL, de Grado M & Finlay BB (1999) Putting *E. coli* on a pedestal: a unique system to study signal transduction and the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol* **9**:11-14.
- Gorden J & Small PL (1993) Acid resistance in enteric bacteria. *Infect Immun* **61**:364-367.
- Gottesman S & Maurizi MR (1992) Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol Rev* **56**(4):592-621.
- Gottesman S (2003) Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**:565-87. Review.
- Grainger DC, Hurd D, Goldberg MD & Busby SJW (2006). Association of nucleoid proteins with coding and non-coding segments of the *Escherichia coli* genome. *Nucleic Acids Res* **34**:4642-4652.
- Green J & Baldwin ML (1997a) The molecular basis for the differential regulation of the *hlyE*-encoded haemolysin of *Escherichia coli* by Fnr and HlyX lies in the improved activating region 1 contact of HlyX. *Microbiology* **143** ( Pt 12):3785-3793.
- Green J & Baldwin ML (1997b) HlyX, the Fnr homologue of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, is a [4Fe-4S]-containing oxygen-responsive transcription regulator that anaerobically activates Fnr-dependent Class I promoters via an enhanced AR1 contact. *Mol Microbiol* **24**:593-605.
- Groisman EA (1998) The ins and outs of virulence gene expression: Mg<sup>2+</sup> as a regulatory signal. *Bioessays* **20**:96-101.
- Groisman EA (2001) The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* **183**:1835-1842.
- Groisman EA, Parra-Lopez C, Salcedo M, Lipps CJ & Heffron F (1992) Resistance to host antimicrobial peptides is necessary for *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:11939-11943.
- Gross R (1993) Signal transduction and virulence regulation in human and animal pathogens. *FEMS Microbiol Rev* **10**:301-326.

- Guina T, Yi EC, Wang H, Hackett M & Miller SI (2000) A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. *J Bacteriol* **182**:4077-4086.
- Gunn JS & Miller SI (1996) PhoP-PhoQ activates transcription of pmrAB, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J Bacteriol* **178**:6857-6864.
- Gunzer F, Henning-Pauka I, Waldmann KH, Sandhoff R, Gröne HJ, Kreipe HH, Matussek A & Mengel M (2002) Gnotobiotic piglets develop thrombotic microangiopathy after oral infection with enterhemorrhagic *Escherichia coli*. *Am. J. Clin. Pathol.* **118**:364-375.
- Guo L, Lim KB, Poduje CM, Daniel M, Gunn JS, Hackett M & Miller SI (1998) Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* **95**:189-198.
- Guzman LM, Belin D, Carson MJ & Beckwith J (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **177**:4121-4130.
- Gyles CL, De Grandis SA, MacKenzie C & Brunton JL (1988) Cloning and nucleotide sequence analysis of the genes determining verocytotoxin production in a porcine edema disease isolate of *Escherichia coli*. *Microb Pathog* **5**:419-426.
- Haider F, Lithgow JK, Stapleton MR, Norte VA, Roberts RE & Green J (2008) DNA recognition by the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium transcription factor SlyA. *Internat microbiol* **11**: 245-250.
- Haque MM, Kabir MS, Aini LQ, Hirata H & Tsuyumu S (2009) SlyA, a MarR family transcriptional regulator, is essential for virulence in *Dickeya dadantii*. *J. Bacteriol* **191**: 5409-5418.
- Harris JR, Wachsmuth IK, Davis BR & Cohen ML (1982) High-molecular-weight plasmid correlates with *Escherichia coli* enteroinvasiveness. *Infect Immun* **37**:1295-1298.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, & 7 other authors (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**:1099–1103.
- Hengge-Aronis R (2000) A role for the sigma S subunit of RNA polymerase in the regulation of bacterial virulence. *Adv Exp Med Biol* **485**:85-93.
- Hengge-Aronis R, Lange R, Henneberg N & Fischer D (1993) Osmotic regulation of rpoS-dependent genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**:259-265.
- Hengge R (2008) The two-component network and the general stress sigma factor RpoS (sigma S) in *Escherichia coli*. *Adv Exp Med Biol* **631**:40-53.  
[javascript:PopUpMenu2\\_Set\(Menu18792681\);](#)
- Herbelin CJ, Chirillo SC, Melnick KA & Whittam TS (2000) Gene conservation and loss in the *mutS-rpoS* genomic region of pathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**:5381-5390.
- Herbst K, Bujara M, Heroven AK, Opitz W, Weichert M, Zimmermann A & Dersch P (2009) *PLoS Pathog* **5**, e1000435.
- Herman C & D'Ari R (1998) Proteolysis and chaperones: the destruction/reconstruction dilemma. *Curr Opin Microbiol* **1**:204-209.

- Heroven AK, Nagel G, Tran HJ, Parr S & Dersch P (2004) RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of invasin and rovA expression in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* **53**:871-888.
- Heroven AK & Dersch P (2006) RovM, a novel LysR-type regulator of the virulence activator gene rovA, controls cell invasion, virulence and motility of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* **62**:1469-1483.
- Hersh BM, Farooq FT, Barstad DN, Blankenhorn DL & Slonczewski JL (1996) A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**:3978-3981.
- Hommais F, Krin E, Coppee JY, Lacroix C, Yeramian E, Danchin A & Bertin P (2004) GadE (YhiE): a novel activator involved in the response to acid environment in *Escherichia coli*. *Microbiology* **150**:61-72.
- Hommais F, Krin E, Laurent-Winter C, *et al.* (2001) Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol Microbiol* **40**:20-36.
- Hong M, Fuangthong M, Helmann JD & Brennan RG (2005) Structure of an OhrR-ohrA operator complex reveals the DNA binding mechanism of the MarR family. *Mol Cell* **20**:131-141.
- Hughes KT, Gillen KL, Semon MJ & Karlinsey JE (1993) Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science* **262**:1277-1280.
- Ingavale S, van Wamel W, Luong TT, Lee CY & Cheung AL (2005) Rat/MgrA, a regulator of autolysis, is a regulator of virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **73**:1423-1431.
- Perera IC, Lee Y-H, Wilkinson SP & Grove A (2009) Mechanism for Attenuation of DNA Binding by MarR Family Transcriptional Regulators by Small Molecule Ligands. *J Mol Biol* **390**: 1019-1029.
- Isberg RR & Leong JM (1990) Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* **60**:861-871.
- Ishihama A (2000) Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol* **54**:499-518.
- Ishii Y & Amano F (2001) Regulation of SulA cleavage by Lon protease by the C-terminal amino acid of SulA, histidine. *Biochem J* **358**:473-480.
- Iyer R, Williams C & Miller C (2003) Arginine-agmatine antiporter in extreme acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**:6556-6561.
- Jackson ME & Pratt JM (1987) An 18 amino acid amphiphilic helix forms the membrane-anchoring domain of the *Escherichia coli* penicillin-binding protein 5. *Mol Microbiol* **1**:23-28.
- Jerse AE, Yu J, Tall BD & Kaper JB (1990) A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:7839-7843.
- Johansson J, Dagberg B, Richet E & Uhlin BE (1998) H-NS and StpA proteins stimulate expression of the maltose regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**:6117-6125.

- Justino MC, Almeida CC, Goncalves VL, Teixeira M & Saraiva LM (2006) *Escherichia coli* YtfE is a di-iron protein with an important function in assembly of iron-sulphur clusters. *FEMS Microbiol Lett* **257**:278-284.
- Kalir S, McClure J, Pabbaraju K, *et al.* (2001) Ordering genes in a flagella pathway by analysis of expression kinetics from living bacteria. *Science* **292**:2080-2083.
- Kalivoda KA, Steenbergen SM, Vimr ER & Plumbridge J (2003) Regulation of sialic acid catabolism by the DNA binding protein NanR in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**:4806-4815.
- Kaper JB (1998) EPEC delivers the goods. *Trends Microbiol* **6**:169-172; discussion 172-163.
- Kaper JB (1996) Defining EPEC. *Rev Microbiol* **27**:130–133.
- Kaper JB, Nataro JP & Mobley HL (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**:123-140.
- Karch H & Kohler B (1999) New knowledge of the molecular biology of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157. *Gesundheitswesen* 61 Spec No 1:S46-51.
- Karch H, Schmidt H & Schwarzkopf A (1996) Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). Die gelben Hefte **36**:126-136.
- Karch H, Bockemühl J & Huppertz HI (2000) Erkrankungen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). Dt. Ärztebl. **97**:2314-2318.
- Karlinsey JE, Tsui HC, Winkler ME & Hughes KT (1998) Flk couples flgM translation to flagellar ring assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **180**:5384-5397.
- Karlinsey JE, Tanaka S, Bettenworth V, Yamaguchi S, Boos W, Aizawa SI & Hughes KT (2000) Completion of the hook-basal body complex of the *Salmonella typhimurium* flagellum is coupled to FlgM secretion and fliC transcription. *Mol Microbiol* **37**:1220-1231.
- Karmali MA (1989) Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* **2**:15-38.
- Kato A, Tanabe H & Utsumi R (1999) Molecular characterization of the PhoP-PhoQ two-component system in *Escherichia coli* K-12: identification of extracellular Mg<sup>2+</sup>-responsive promoters. *J Bacteriol* **181**:5516-5520.
- Kato A, Ohnishi H, Yamamoto K, Furuta E, Tanabe H & Utsumi R (2000) Transcription of emrKY is regulated by the EvgA-EvgS two-component system in *Escherichia coli* K-12. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**:1203-1209.
- Kato A, Groisman EA; Howard Hughes Medical Institute (2008). The PhoQ/PhoP regulatory network of *Salmonella enterica*. *Adv Exp Med Biol* **631**:7-21.  
[javascript:PopUpMenu2\\_Set\(Menu18792679\);](#)
- Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA & Finlay BB (1997) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**:511-520.
- Klauck E, Bohringer J & Hengge-Aronis R (1997) The LysR-like regulator LeuO in *Escherichia coli* is involved in the translational regulation of rpoS by affecting the expression of the small regulatory DsrA-RNA. *Mol Microbiol* **25**:559-569.

- Knutton S, Lloyd DR & McNeish AS (1987) Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect Immun* **55**:69-77.
- Knutton S, Lloyd DR & McNeish AS (1987) Identification of a new fimbrial structure in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) serotype O148:H28 which adheres to human intestinal mucosa: a potentially new human ETEC colonization factor. *Infect Immun* **55**:86-92.
- Knutton S, Baldini MM, Kaper JB & McNeish AS (1987) Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells. *Infect Immun* **55**:78-85.
- Knutton S, Baldwin T, Williams PH & McNeish AS (1989) Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **57**:1290-1298.
- Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ, *et al.* (1998) A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *Embo J* **17**:2166-2176.
- Komeda Y (1986) Transcriptional control of flagellar genes in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **168**:1315-1318.
- Kong W, Weatherspoon N & Shi, Y (2008) Molecular mechanism for establishment of signal-dependent regulation in the PhoP/PhoQ system *J Biol Chem* **283**:16612-16621.
- Kovacikova G & Skorupski K (1999) A *Vibrio cholera* LysR homolog, AphB, cooperates with AphA at the tcpPH promoter to activate expression of the ToxR virulence cascade. *J Bacteriol* **181**:4250-4256.
- Kovacikova G, Lin W & Skorupski K (2004) *Vibrio cholerae* AphA uses a novel mechanism for virulence gene activation that involves interaction with the LysR-type regulator AphB at the tcpPH promoter. *Mol Microbiol* **53**:129-142.
- Kox LF, Wosten MM & Groisman EA (2000) A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system. *EMBO J* **19**:1861-1872.
- Krogfelt KA, Hjulgaard M, Sorensen K, Cohen PS & Givskov M (2000) *rpoS* gene function is a disadvantage for *Escherichia coli* BJ4 during competitive colonization of the mouse large intestine. *Infect Immun* **68**:2518-24.
- Kutsukake K & Iino T (1994) Role of the FlhA-FlgM regulatory system on the transcriptional control of the flagellar regulon and flagellar formation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**:3598-3605.
- Laaberki, MH, Janabi N, Oswald E & Repoila F (2006) Concert of regulators to switch on LEE expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: interplay between Ler, GrlA, HNS and RpoS. *Int J Med Microbiol* **296**:197-210.
- Lai XH, Johansson AI, Wai SN, Oscarsson J, Kalfas S, Sundqvist KG, Mizunoe Y, Sjöstedt A & Uhlin BE (2000) Cytocidal and apoptotic effects of the ClyA protein from *Escherichia coli* on primary and cultured monocytes and macrophages. *Infect Immun* **68**:4363-4367.

- Lane MC, Simms AN & Mobley HL (2007) complex interplay between type 1 fimbrial expression and flagellum-mediated motility of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**:5523-5533.
- Lang B, Blot N, Bouffartigues E, Buckle M, Geertz M, Gualerzi CO, Mavathur R, Muskhelishvili G, Pon CL & other authors (2007) High-affinity DNA binding sites for H-NS provide a molecular basis for selective silencing within proteobacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **35**:6330-6337.
- Lange R & Hengge-Aronis R (1991) Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**:49-59.
- Laurent-Winter C, Ngo S, Danchin A & Bertin P (1997) Role of *Escherichia coli* histone-like nucleoid-structuring protein in bacterial metabolism and stress response--identification of targets by two-dimensional electrophoresis. *Eur J Biochem* **244**:767-773.
- Lawrenz MB, Miller VL (2007) Comparative analysis of the regulation of *rovA* from the pathogenic *Yersinia*. *J Bacteriol* **189**(16):5963-75.
- Le Bougu  nec C, Servin AL (2006) Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiol Lett* **256**(2):185-94.
- Lee DH, Huo L & Schleif R (1992) Repression of the *araBAD* promoter from *araO1*. *J Mol Biol* **224**:335-341.
- Lehnen D, Blumer C, Polen T, Wackwitz B, Wendisch VF & Uden G (2002) LrhA as a new transcriptional key regulator of flagella, motility and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **45**:521-532.
- Lejona S, Aguirre A, Cabeza ML, Garcia Vescovi E & Soncini FC (2003) Molecular characterization of the Mg<sup>2+</sup>-responsive PhoP-PhoQ regulon in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **185**:6287-6294.
- Levine MM & Edelman R (1984) Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol Rev* **6**:31-51.
- Levine MM, Bergquist EJ, Nalin DR, Waterman DH, Hornick RB, Young CR & Sotman S (1978) *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet* **1**:1119-1122.
- Libby SJ, Goebel W, Ludwig A, et al. (1994) A cytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:489-493.
- Licht S & Lee I (2008) Resolving individual steps in the operation of ATP-dependent proteolytic molecular machines: from conformational changes to substrate translocation and processivity. *Biochemistry* **47**:3595-3605.
- Lim D, Poole K & Strynadka NC (2002) Crystal structure of the MexR repressor of the *mexRAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **277**:29253-29259.
- Linehan SA, Rytkenon A, Yu XJ, Liu M & Holden DW (2005) SlyA regulates function of *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) and expression of SPI-2-associated genes. *Infect Immun* **73**:4354-4362.

- Lin J, Lee IS, Frey J, Slonczewski JL & Foster JW (1995) Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**:4097-4104.
- Lin J, Smith MP, Chapin KC, Baik HS, Bennett GN & Foster JW (1996) Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **62**:3094-3100.
- Li X, Rasko DA, Lockatell CV, Johnson DE & Mobley HL (2001) Repression of bacterial motility by a novel fimbrial gene product. *Embo J* **20**:4854-4862.
- Lithgow JK, Haider F, Roberts IS & Green J (2007) Alternate SlyA and H-NS nucleoprotein complexes control *hlyE* expression in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **66**:685-698.
- Liu H, Magoun L & Leong JM (1999)  $\beta_1$ -chain integrins are not essential for intimin-mediated host cell attachment and enteropathogenic *Escherichia coli*-induced actin condensation. *Infect. Immun* **67**:2045-2049.
- Liu X & De Wulf P (2004) Probing the ArcA-P modulon of *Escherichia coli* by whole genome transcriptional analysis and sequence recognition profiling. *J Biol Chem* **279**:12588-12597.
- Liu X & Matsumura P (1994) The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J Bacteriol* **176**:7345-7351.
- Liu Y, Manna A, Li R, Martin WE, Murphy RC, Cheung AL & Zhang G (2001) Crystal structure of the SarR protein from *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:6877-6882.
- Loewen PC & Triggs BL (1984) Genetic mapping of *katF*, a locus that with *katE* affects the synthesis of a second catalase species in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **160**:668-675.
- Loewen PC, Hu B, Strutinsky J & Sparling R (1998) Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* **44** 8:707-717.
- Lucchini S, Rowley G, Goldberg MD, Hurd D, Harrison M & Hinton JCD (2006). H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PloS Pathog* **2**:e81.
- Lucht JM, Dersch P, Kempf B & Bremer E (1994) Interactions of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled *proU* operon on *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem* **269**:6578–6586.
- Ludwig A, Tengel C, Bauer S, Bubert A, Benz R, Mollenkopf HJ & Goebel W (1995) SlyA, a regulatory protein from *Salmonella typhimurium*, induces a haemolytic and pore-forming protein in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **249**:474-486.
- Ludwig A, Bauer S, Benz R, Bergmann B & Goebel W (1999) Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **31**:557-567.
- Ludwig A, von Rhein C, Bauer S, Hüttinger C & Goebel W (2004) Molecular analysis of cytolysin A (ClyA) in pathogenic *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol* **186**:5311-5320.
- Ludwig A, von Rhein C, Mischke A & Brade V (2008) Release of latent ClyA cytolysin from *Escherichia coli* mediated by a bacteriophage-associated putative holin (BlyA) from *Borrelia burgdorferi*. *Int J Med Microbiol* **298**(5-6):473-81.



- Lutz R & Bujard H (1997) Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res* **25**:1203-1210.
- Lynch AS & Lin EC (1996) Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli*: characterization of DNA binding at target promoters. *J Bacteriol* **178**:6238-6249.
- Madrid C, Nieto JM, Paytubi S, Falconi M, Gualerzi CO & Juárez A (2002) Temperature- and H-NS-dependent regulation of a plasmid-encoded virulence operon expressing *Escherichia coli* hemolysin. *J Bacteriol* **184**(18):5058-66.
- Manoil C & Beckwith J (1986) A genetic approach to analyzing membrane protein topology. *Science* **233**:1403-8.
- Martin RG & Rosner JL (2001) The AraC transcriptional activators. *Curr Opin Microbiol* **4**(2):132-7.
- Masuda N & Church GM (2002) *Escherichia coli* gene expression responsive to levels of the response regulator EvgA. *J Bacteriol* **184**:6225-6234.
- Masuda N & Church GM (2003) Regulatory network of acid resistance genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **48**:699-712.
- Ma Z, Masuda N & Foster JW (2004) Characterization of EvgAS-YdeO-GadE branched regulatory circuit governing glutamate-dependent acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**:7378-7389.
- Ma Z, Richard H, Tucker DL, Conway T & Foster JW (2002) Collaborative regulation of *Escherichia coli* glutamate-dependent acid resistance by two AraC-like regulators, GadX and GadW (YhiW). *J Bacteriol* **184**:7001-7012.
- Ma Z, Gong S, Richard H, Tucker DL, Conway T & Foster JW (2003) GadE (YhiE) activates glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **49**:1309-1320.
- McCann MP, Kidwell JP & Matin A (1991) The putative sigma factor KatF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**:4188-4194.
- McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, *et al.* (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**:852-856.
- McClelland M, Sanderson KE, Clifton SW, *et al.*, (2004) Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. *Nat Genet* **36**:1268-1274.
- McDaniel TK & Kaper JB (1997) A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol* **23**:399-407.
- McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS & Kaper JB (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:1664-1668.

- McKee ML, Melton-Celsa AR, Moxley RA, Francis DH & O'Brien AD (1995) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to HEP-2 cells. *Infect Immun* **63**:3739-3744.
- Mellies JL, Elliott SJ, Sperandio V, Sonnenberg MS & Kaper JB (1999) The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli* : identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol* **33**:296-306.
- Menard R, Dehio C & Sansonetti PJ (1996) Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of *Shigella*. *Trends Microbiol* **4**:220-226.
- Menard R, Prevost MC, Gounon P, Sansonetti P & Dehio C (1996) The secreted Ipa complex of *Shigella flexneri* promotes entry into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:1254-1258.
- Miller JH (1992) A Short Course in Bacterial Genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Miller SI, Kukral AM & Mekalanos JJ (1989) A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:5054-5058.
- Miller SI, Pulkkinen WS, Selsted ME & Mekalanos JJ (1990) Characterization of defensin resistance phenotypes associated with mutations in the phoP virulence regulon of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **58**:3706-3710.
- Miller VL & Mekalanos JJ (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. *J Bacteriol* **170**:2575-2583.
- Minagawa S, Ogasawara H, Kato A, Yamamoto K, Eguchi Y, Oshima T, Mori H, Ishihama A & Utsumi R (2003) Identification and molecular characterization of the Mg<sup>2+</sup> stimulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**:3696-3702.
- Mizuno T (1997) Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res.* **4**:161-168.
- Mondragon V, Franco B, Jonas K, Suzuki K, Romeo T, Melefors O & Georgellis D (2006) pH-dependent activation of the BarA-UvrY two-component system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**:8303-8306.
- Monsieurs P, De Keersmaecker S, Navarre WW, Bader MW, De Smet F, McClelland M, Fang FC, De Moor B, Vanderleyden J & Marchal K (2005) Comparison of the PhoPQ regulon in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Mol Evol* **60**:462-474.
- Moon HW (1997) Comparative histopathology of intestinal infections. *Adv Exp Med Biol* **412**:1-19.
- Mooney RA, Darst SA, Landick R (2005) Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? *Mol Cell* **20**(3):335-45.
- Mueller M, Grauschopf U, Maier T, Glockshuber R & Ban N (2009) The structure of a cytolytic alpha-helical toxin pore reveals its assembly mechanism. *Nature* **459**: 726-730.

- Nagel G, Lahrz A & Dersch P (2001) Environmental control of invasins expression in *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family. *Mol Microbiol* **41**:1249-1269.
- Nataro JP & Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**:142-201.
- Nataro JP, Steiner T & Guerrant RL (1998) Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* **4**:251-261.
- Navarre WW, Halsey TA, Walther D, *et al.* (2005) Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. *Mol Microbiol* **56**:492-508.
- Navarre WW, Porwollik S, Wang Y, McClelland M, Rosen H, Libby SJ & Fang FC (2006) Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* **313**:236-238.
- Navarre WW, McClelland M, Libby SJ & Fang FC (2007) Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA. *Genes Dev* **21**:1456-1471.
- Nieto JM, Madrid C, Miquel E, Parra JL, Rodríguez S & Juárez A (2002) Evidence for Direct Protein-Protein Interaction between Members of the Enterobacterial Hha/YmoA and H-NS Families of Proteins. *J Bacteriol* **184**(3):629-635.
- Niland P, Huhne R & Muller-Hill B (1996) How AraC interacts specifically with its target DNAs. *J Mol Biol* **264**:667-674.
- Nishino K & Yamaguchi A (2001) Overexpression of the response regulator *evgA* of the two-component signal transduction system modulates multidrug resistance conferred by multidrug resistance transporters. *J Bacteriol* **183**:1455-1458.
- Nishino K, Inazumi Y & Yamaguchi A (2003) Global analysis of genes regulated by EvgA of the two-component regulatory system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**:2667-2672.
- Noom MC, Navarre WW, Oshima T, Wuite GJ & Dame RT (2007) H-NS promoters looped domain formation in the bacterial chromosome. *Curr Biol* **17**:R913-R914.
- Norte VA, Stapleton MR & Green J (2003) PhoP-responsive expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *slyA* gene. *J Bacteriol* **185**:3508-3514.
- Notley-McRobb L, King T & Ferenci T (2002) *rpoS* mutations and loss of general stress resistance in *Escherichia coli* populations as a consequence of conflict between competing stress responses. *J Bacteriol* **184**(3):806-11.
- Nougayrède JP, Fernandes PJ & Donnenberg MS (2003) Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiol* **5**(6):359-72.
- Nye MB & Taylor RK (2003) *Vibrio cholerae* H-NS domain structure and function with respect to transcriptional repression of ToxR regulon genes reveals differences among H-NS family members. *Mol Microbiol* **50**:427-444.
- O'Brien AD, Newland JW, Miller SF, Holmes RK, Smith HW & Formal SB (1984) Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* **226**:694-696.

- O'Brien AD, Tesh VL, Donohue-Rolfe A, *et al.* (1992) Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* **180**:65-94.
- Ohnishi K, Kutsukake K, Suzuki H & Iino T (1990) Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* **221**:139-147.
- Okada N, Oi Y, Takeda-Shitaka M, Kanou K, Umeyama H, Haneda T, Miki T, Hosoya S & Danbara H (2007) Identification of amino acid residues of *Salmonella* SlyA that are critical for transcriptional regulation. *Microbiology* **153**:548-60.
- Ono S, Goldberg MD, Olsson T, Esposito D, Hinton JC & Ladbury JE (2005) H-NS is a part of a thermally controlled mechanism for bacterial gene regulation. *Biochem J* **391**:203-213.
- Oscarsson J, Mizunoe Y, Uhlin BE & Haydon DJ (1996) Induction of haemolytic activity in *Escherichia coli* by the *slyA* gene product. *Mol Microbiol* **20**:191-199.
- Oscarsson J, Mizunoe Y, Li L, Lai XH, Wieslander A & Uhlin BE (1999) Molecular analysis of the cytolytic protein ClyA (SheA) from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **32**:1226-1238.
- Oscarsson J, Westermarck M, Löfdahl S, Olsen B, Palmgren H, Mizunoe Y, Wai SN, Uhlin BE (2002) Characterization of a pore-forming cytotoxin expressed by *Salmonella enterica* serovars typhi and paratyphi A. *Infect Immun* **70**(10):5759-69.
- Ostroff SM, Tarr PI, Neill MA, Lewis JH, Hargrett-Bean N & Kobayashi JM (1989) Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *J Infect Dis* **160**:994-998.
- Ottemann KM & Miller JF (1997) Roles for motility in bacterial-host interactions. *Mol Microbiol* **24**:1109-1117.
- Oyofa BA, Subekti DS, Svennerholm AM, Machpud NN, Tjaniadi P, Komalarini TS, Setiawan B, Campbell JR, Corwin AL & Lesmana M (2001) Toxins and colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* among residents of Jakarta, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* **65**(2):120-4.
- Park YK, Bearson B, Bang SH, Bang IS & Foster JW (1996) Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **20**:605-611.
- Parsot C & Sansonetti PJ (1996) Invasion and the pathogenesis of *Shigella* infections. *Curr Top Microbiol Immunol* **209**:25-42.
- Parsot C (2005) *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiol Lett* **252**(1):11-8.
- Paton AW & Paton JC (1998) Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J Clin Microbiol* **36**:598-602.
- Perez JC, Latifi T & Groisman EA (2008) Overcoming H-NS-mediated transcriptional silencing of horizontally acquired genes by the PhoP and SlyA proteins in *Salmonella enterica*. *J Biol Chem* **283**:10773-10783.
- Plumbridge J & Vimr E (1999) Convergent pathways for utilization of the amino sugars N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine, and N-acetylneuraminic acid by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**:47-54.

- Price SB, Cheng CM, Kaspar CW, Wright JC, DeGraves FJ, Penfound TA, Castanie-Cornet MP, & Foster JW (2000) Role of *rpoS* in acid resistance and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **66**:632-7.
- Prosseda G, Falconi M, Giangrossi M, Gualerzi CO, Micheli G & Colonna B (2004) The virF promotor in Shigella: more than just a curved DNA stretch. *Mol Microbiol* **51**:523-537.
- Prosseda G, Carmela Latella M, Barbagallo M, Nicoletti M, Al Kassas R, Casalino M & Colonna B (2007) The two-faced role of cad genes in the virulence of pathogenic *Escherichia coli*. *Research in microbiology* **158**: 487-493.
- Prost LR, Daley ME, Le Sage V, Bader MW, Le Moual H, *et al.* (2007) Activation of the Bacterial Sensor Kinase PhoQ by Acidic pH. *Molecular Cell* **26**:165-174.
- Prost LR, Sanowar S & Miller SI (2007) *Salmonella* sensing of anti-microbial mechanisms to promote survival within macrophages. *Immunol Rev* **219**: 55–65.
- Prost LR & Miller SI (2008) The *Salmonellae* PhoQ sensor: mechanisms of detection of phagosome signals. *Cell Microbiol* **10**(3):576-82.
- Prüß BM (2000) FlhD, a transcriptional regulator in bacteria. *Recent Res Dev Microbiol* **4**:31-42.
- Prüss BM, Liu X, Hendrickson W & Matsumura P (2001) FlhD/FlhC-regulated promoters analyzed by gene array and lacZ gene fusions. *FEMS Microbiol Lett* **197**(1):91-7.
- Quail MA, Haydon DJ & Guest JR (1994) The *pdhR-aceEF-lpd* operon of *Escherichia coli* expresses the pyruvate dehydrogenase complex. *Mol Microbiol* **12**:95-104.
- Rainer J, Sanchez-Cabo F, Stocker G, Sturn A & Trajanoski Z (2006) CARMAweb: comprehensive R- and bioconductor-based web service for microarray data analysis. *Nucleic Acids Res.* **34**(Web Server issue):W498-503.
- Ralph ET, Guest JR & Green J (1998) Altering the anaerobic transcription factor Fnr confers a hemolytic phenotype on *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:10449-10452.
- Reeder T & Schleif R (1993) AraC protein can activate transcription from only one position and when pointed in only one direction. *J Mol Biol* **231**:205-218.
- Revell PA & Miller VL (2000) A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene and for virulence. *Mol Microbiol* **35**:677-685.
- Reverchon S, Rouanet C, Expert D & Nasser W (2002) Characterization of indigoidine biosynthetic genes in *Erwinia chrysanthemi* and role of this blue pigment in pathogenicity. *J Bacteriol* **184**:654-665.
- Richard HT & Foster JW (2003) Acid resistance in *Escherichia coli*. *Adv Appl Microbiol* **52**:167-186.
- Rimsky S, Zuber F, Buckle M & Buc H (2001) A molecular mechanism for the repression of transcription by the H-NS protein. *Mol Microbiol* **42**:1311-1323.
- Rine J (1999) On the mechanism of silencing in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:8309-8311.

Robinson VL, Buckler DR & Stock AM (2000) A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch. *Nat Struct Biol* **7**:626-633.

Rodionov DA, Dubchak IL, Arkin AP, Alm EJ & Gelfand MS (2005) Dissimilatory metabolism of nitrogen oxides in bacteria: comparative reconstruction of transcriptional networks. *PLoS Comput Biol* **1**(5):e55. PMID: 16261196.

Rodríguez-Angeles G (2002) Principal characteristics and diagnosis of the pathogenic groups of *Escherichia coli* *Salud Publica Mex* **44**(5):464-75.

[javascript:PopUpMenu2\\_Set\(Menu12389490\);](#)

Roggenkamp A, Neuberger HR, Flugel A, Schmoll T & Heesemann J (1995) Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol Microbiol* **16**:1207-1219.

Rohde JR, Fox JM & Minnich SA (1994) Thermoregulation in *Yersinia enterocolitica* is coincident with changes in DNA supercoiling. *Mol Microbiol* **12**:187-199.

Roper DI, Fawcett T & Cooper RA (1993) The *Escherichia coli* C homoprotocatechuate degradative operon: hpc gene order, direction of transcription and control of expression. *Mol Gen Genet* **237**:241-250.

Rosenshine I, Ruschkowski S & Finlay BB (1996) Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic *Escherichia coli* depends on growth phase, temperature, and protein synthesis upon contact with epithelial cells. *Infect Immun* **64**:966-973.

Rosenshine I, Ruschkowski S, Stein M, Reinscheid DJ, Mills SD & Finlay BB (1996) A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *Embo J* **15**:2613-2624.

Sak BD, Eisenstark A & Touati D (1989) Exonuclease III and the catalase hydroperoxidase II in *Escherichia coli* are both regulated by the katF gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:3271-3275.

Salmon K, Hung SP, Mekjian K, Baldi P, Hatfield GW & Gunsalus RP (2003) Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K-12. The effects of oxygen availability and Fnr. *J Biol Chem* **278**:29837-29855.

Salmon KA, Hung SP, Steffen NR, Krupp R, Baldi P, Hatfield GW & Gunsalus RP (2005) Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K-12: effects of oxygen availability and ArcA. *J Biol Chem* **280**:15084-15096.

Sambrook J, Fritsch E & Maniatis T (1989) Molecular Cloning. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sandvig K & van Deurs B (1992) Toxin-induced cell lysis: protection by 3-methyladenine and cycloheximide. *Exp Cell Res* **200**:253-262.

Sandvig K, Garred O, Prydz K, Kozlov JV, Hansen SH & van Deurs B (1992) Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature* **358**:510-512.

Sandvig K, Dubinina E, Garred O, Prydz K, Kozlov JV, Hansen SH & van Deurs B (1992) Protein toxins: mode of action and cell entry. *Biochem Soc Trans* **20**:724-727.

Sanger F, Nicklen S & Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463-5467.

- Sauer RT, Bolon DN, Burton BM, Burton RE, Flynn JM, *et al.*, (2004) Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines. *Cell* **199**:9-18.
- Saxena SK, O'Brien AD & Ackerman EJ (1989) Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA N-glycosidases of 28 S RNA when microinjected into *Xenopus oocytes*. *J Biol Chem* **264**:596-601.
- Scaletsky IC, Silva ML & Trabulsi LR (1984) Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun* **45**:534-536.
- Schell MA (1993) Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **47**:597-626.
- Schmidt H, Bielaszewska M & Karch H (1999) Transduction of enteric *Escherichia coli* isolates with a derivative of Shiga toxin 2-encoding bacteriophage phi3538 isolated from *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **65**:3855-3861.
- Schmitt CK, McKee ML & O'Brien AD (1991) Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. *Infect Immun* **59**:1065-1073.
- Schneider T, Barbosa TM, McMurry LM & Levy SB (2004) The *Escherichia coli* transcriptional regulator MarA directly represses transcription of *purA* and *hdeA*. *J Biol Chem* **279**:9037-9042.
- Schroder O & Wagner R (2002) The bacterial regulatory protein H-NS — a versatile modulator of nucleic acid structures. *Biol Chem* **383**:945-960.
- Seabold RR & Schleif RF (1998) Apo-AraC actively seeks to loop. *J Mol Biol* **278**:529-538.
- Sears CL & Kaper JB (1996) Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev* **60**:167-215.
- Servin AL (2005) Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin Microbial Rev.* **18**(2):264-92.
- Shalel-Levanon S, San KY & Bennett GN (2005) Effect of ArcA and Fnr on the expression of genes related to the oxygen regulation and the glycolysis pathway in *Escherichia coli* under microaerobic growth conditions. *Biotechnol Bioeng* NIL. PMID: 15988767.
- Shimada T, Hirao K, Kori A, Yamamoto K & Ishihama A (2007) RutR is the uracil/thymine-sensing master regulator of a set of genes for synthesis and degradation of pyrimidines. *Mol Microbiol* **66**:744-757.
- Shin M, Song M, Rhee JH, *et al.* (2005) DNA looping-mediated repression by histone-like protein H-NS: specific requirement of Esigma70 as a cofactor for looping. *Genes Dev* **19**:2388-2398.
- Shin S, Castanie-Cornet MP, Foster JW, Crawford JA, Brinkley C & Kaper JB (2001) An activator of glutamate decarboxylase genes regulates the expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes through control of the plasmid-encoded regulator, Per. *Mol Microbiol* **41**: 1133-1150.
- Shi W, Zhou Y, Wild J, Adler J & Gross CA (1992) DnaK, DnaJ, and GrpE are required for flagellum synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**:6256-6263.

- Shi Y, Cromie MJ, Hsu FF, Turk J & Groisman EA (2004) PhoP-regulated *Salmonella* resistance to the antimicrobial peptides magainin 2 and polymyxin B. *Mol Microbiol* **53**: 229–241.
- Shi Y, Latifi T, Cromie MJ & Groisman EA (2004) Transcriptional control of the antimicrobial peptide resistance *ugtL* gene by the *Salmonella* PhoP and SlyA regulatory proteins. *J Biol Chem* **279**:38618-38625.
- Silva RM, Toledo MR & Trabulsi LR (1980) Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **11**:441-444.
- Simm R, Morr M, Kader A, Nimtz M & Romling U (2004) GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* **53**:1123-1134.
- Simms AN & Mobley HL (2008) Multiple genes repress motility in uropathogenic *Escherichia coli* constitutively expressing type 1 fimbriae. *J Bacteriol* **190**:3747-3756.
- Simon R, Reifer U & Pühler A (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *BioTechnology* **1**:784–791.
- Sinclair JF & O'Brien AD (2002) Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem* **277**:2876-2885.
- Sinclair JF & O'Brien AD (2004) Intimin types alpha, beta, and gamma bind to nucleolin with equivalent affinity but lower avidity than to the translocated intimin receptor. *J. Biol. Chem* **279**:33751-33758.
- Small P, Blankenhorn D, Welty D, Zinser E & Slonczewski JL (1994) Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. *J Bacteriol* **176**:1729-1737.
- Smith DK, Kassam T, Singh B & Elliott JF (1992) *Escherichia coli* has two homologous glutamate decarboxylase genes that map to distinct loci. *J Bacteriol* **174**:5820-5826.
- Smyth CP, Lundback T, Renzoni D, et al. (2000) Oligomerization of the chromatin-structuring protein H-NS. *Mol Microbiol* **36**:962-972.
- Soncini FC & Groisman EA (1996) Two-component regulatory systems can interact to process multiple environmental signals. *J Bacteriol* **178**:6796-6801.
- Soncini FC, Garcia Vescovi E, Solomon F & Groisman EA (1996) Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella typhimurium*: identification of PhoP-regulated genes. *J Bacteriol* **178**:5092-5099.
- Song H, Kong W, Weatherspoon N, Qin G, Tyler W, Turk J, Curtiss R & Shi Y (2008) Modulation of the regulatory activity of bacterial two-component systems by slyA. *J Biol Chem* **283**(42):28158-28168.
- Spangler BD (1992) Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* **56**:622-647.
- Spassky A, Rimsky S, Garreau H & Buc H (1984) H1a, an *E. coli* DNA-binding protein which accumulates in stationary phase, strongly compacts DNA in vitro. *Nucleic Acids Res* **12**:5321-5340.



- Spory A, Bosserhoff A, von Rhein C, Goebel W & Ludwig A (2002) Differential regulation of multiple proteins of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by the transcriptional regulator SlyA. *J Bacteriol* **184**:3549-3559.
- Spurio R, Falconi M, Brandi A, Pon CL & Gualerzi CO (1997) The oligomeric structure of nucleoid protein H-NS is necessary for recognition of intrinsically curved DNA and for DNA bending. *Embo J* **16**:1795-1805.
- Srikumar R, Kon T, Gotoh N & Poole K (1998) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:65-71.
- Stapleton MR, Norte VA, Read RC & Green J (2002) Interaction of the *Salmonella typhimurium* transcription and virulence factor SlyA with target DNA and identification of members of the SlyA regulon. *J Biol Chem* **277**:17630-17637.
- Starcic-Erjavec M, van Putten JP, Gaastra W, Jordi BJ, Grabnar M & Zgur-Bertok D (2003) H-NS and Lrp serve as positive modulators of traJ expression from the *Escherichia coli* plasmid pRK100. *Mol Genet Genomics* **270**:94-102.
- Stephani K, Weichart D & Hengge R (2003) Dynamic control of Dps protein levels by ClpXP and ClpAP proteases in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **49**:1605-1614.
- Stim KP & Bennett GN (1993) Nucleotide sequence of the adi gene, which encodes the biodegradative acid-induced arginine decarboxylase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**:1221-1234.
- Stoebel DM, Free A & Dorman CJ (2008) Anti-silencing: overcoming H-NS-mediated repression of transcription in Gram-negative enteric bacteria. *Microbiology* **154**(Pt 9):2533-45.
- Studier FW & Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**:113-130.
- Tennant SM, Tauschek M, Azzopardi K, Bigham A, Bennett-Wood V, Hartland EL, Qi W, Whittam TS, Robins-Browne RM (2009) Characterisation of atypical enteropathogenic *E. coli* strains of clinical origin. *BMC Microbiol* **9**:117.
- Tobe T, Schoolnik GK, Sohel I, Bustamante VH & Puente JL (1996) Cloning and characterization of bfpTVW, genes required for the transcriptional activation of bfpA in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **21**:963-975.
- Thomson NR, Cox A, Bycroft BW, Stewart GS, Williams P & Salmond GP (1997) The rap and hor proteins of *Erwinia*, *Serratia* and *Yersinia*: a novel subgroup in a growing superfamily of proteins regulating diverse physiological processes in bacterial pathogens. *Mol Microbiol* **26**:531-544.
- Tisa LS & Adler J (1995) Chemotactic properties of *Escherichia coli* mutants having abnormal Ca<sup>2+</sup> content. *J Bacteriol* **177**:7112-7118.
- Tomoyasu T, Ogura T, Tatsuta T & Bukau B (1998) Levels of DnaK and DnaJ provide tight control of heat shock gene expression and protein repair in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **30**:567-581.

- Tomoyasu T, Mogk A, Langen H, Goloubinoff P & Bukau B (2001) Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Mol Microbiol* **40**:397-413.
- Torres AG & Kaper JB (2002) Pathogenicity islands of intestinal *E. coli*. *Curr Top Microbiol Immunol* **264**(1):31-48. [javascript:PopUpMenu2\\_Set\(Menu12014180\);](#)
- Towbin H, Staehelin T & Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4350-4354.
- Tramonti A, Visca P, De Canio M, Falconi M & De Biase D (2002) Functional characterization and regulation of gadX, a gene encoding an AraC/XylS-like transcriptional activator of the *Escherichia coli* glutamic acid decarboxylase system. *J Bacteriol* **184**:2603-2613.
- Tran HJ, Heroven AK, Winkler L, Spreter T, Beatrix B & Dersch P (2005) Analysis of RovA, a transcriptional regulator of *Yersinia pseudotuberculosis* virulence that acts through antirepression and direct transcriptional activation. *J Biol Chem* **280**:42423-42432.
- Tucker DL, Tucker N, Ma Z, Foster JW, Miranda RL, Cohen PS & Conway T (2003) Genes of the GadX-GadW regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**(10):3190-201.
- Typas A, Barembruch C, Possling A, & Hengge R (2007). Stationary phase reorganisation of the *Escherichia coli* transcription machinery by Crl protein, a fine-tuner of sigmas activity and levels. *Embo J* **26**:1569-78.
- Tyson K, Busby S & Cole J (1997) Catabolite regulation of two *Escherichia coli* operons encoding nitrite reductases: role of the Cra protein. *Arch Microbiol* **168**(3): 240-4.
- Tzokov SB, Wyborn NR, Stillman TJ, Jamieson S, Czudnochowski N, Artymiuk PJ, Green J & Bullough PA (2006) Structure of the hemolysin E (HlyE, ClyA, and SheA) channel in its membrane-bound form *J Biol Chem* **281**:23042-23049.
- Ueguchi C & Mizuno T (1993) The *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS functions directly as a transcriptional repressor. *Embo J* **12**:1039-1046.
- Ueguchi C & Mizuno T (1996) Purification of H-NS protein and its regulatory effect on transcription in vitro. *Methods Enzymol* **274**:271-276.
- Ueguchi C, Seto C, Suzuki T & Mizuno T (1997) Clarification of the dimerization domain and its functional significance for the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *J Mol Biol* **274**:145-151.
- Utsumi R, Katayama S, Ikeda M, *et al.* (1992) Cloning and sequence analysis of the evgAS genes involved in signal transduction of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Symp Ser* 149-150.
- Utsumi R, Katayama S, Taniguchi M, *et al.* (1994) Newly identified genes involved in the signal transduction of *Escherichia coli* K-12. *Gene* **140**:73-77.
- Vanden Boom T & Cronan JE, Jr. (1990) A physical-genetic map of the lipid-containing bacteriophage PR4. *Virology* **177**:23-32.
- van Velkinburgh JC & Gunn JS (1999) PhoP-PhoQ-regulated loci are required for enhanced bile resistance in *Salmonella* spp. *Infect Immun* **67**:1614-1622.

- Vescovi EG, Soncini FC & Groisman EA (1996) Mg<sup>2+</sup> as an Extracellular Signal: Environmental Regulation of Salmonella Virulence. *Cell* **84**:165-174.
- Vescovi EG, Ayala YM, Di Cera E & Groisman EA (1997) Characterization of the bacterial sensor protein PhoQ. Evidence for distinct binding sites for Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>. *J Biol Chem* **272**:1440-1443.
- Vial PA, Robins-Browne R, Lior H, *et al.* (1988) Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J Infect Dis* **158**:70–79.
- von Rhein C, Bauer S, Simon V & Ludwig A (2008) Occurrence and characteristics of the cytolysin A gene in *Shigella* strains and other members of the family *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiol Lett* **287**: 143-148.
- von Rhein C, Bauer S, Sanjurjo E, Benz R, Goebel W & Ludwig A (2009) ClyA cytolysin from *Salmonella*: Distribution within the genus, regulation of expression by SlyA, and pore-forming characteristics. *Int J Med Microbiol* **299**: 21-35.
- Vuopio-Varkila J & Schoolnik GK (1991) Localized adherence by enteropathogenic *Escherichia coli* is an inducible phenotype associated with the expression of new outer membrane proteins. *J Exp Med* **174**:1167-1177.
- Wade JT, Struhl K, Busby SJW & Grainger DC (2007) Genomic analysis of protein-DNA interaction in bacteria: insights into transcription and chromosome organization. *Mol Microbiol* **65**:21-26.
- Wallace AJ, Stillman TJ, Atkins A, Jamieson SJ, Bullough PA, Green J & Artymiuk PJ (2000) *E. coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. *Cell* **100**:265-276.
- Wang H & Gunsalus RP (2000) The *nrfA* and *nirB* nitrite reductase operons in *Escherichia coli* are expressed differently in response to nitrate than to nitrite. *J Bacteriol* **182**(20):5813-22.
- Wang Y & Kim KS (2000) Effect of *rpoS* mutations on stress-resistance and invasion of brain microvascular endothelial cells in *Escherichia coli* K1. *FEMS Microbiol Lett* **182**:241-7.
- Waterman SR & Small PL (1998) Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources. *Appl Environ Microbiol* **64**:3882-3886.
- Weinstein DL, Jackson MP, Samuel JE, Holmes RK & O'Brien AD (1988) Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J Bacteriol* **170**:4223-4230.
- Weintraub A (2007) Enterotoxigenic *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. *J Med Microbiol* **56**(Pt 1):4-8.
- Westermarck M, Oscarsson J, Mizunoe Y, Urbonaviciene J & Uhlin BE (2000) Silencing and activation of ClyA cytotoxin expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**:6347-6357.
- White-Ziegler CA, Malhowski AJ & Young S (2007) Human body temperature (37°C) increases the expression of iron, carbohydrate, and amino acid utilization genes in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **189**:5429-5440.
- Wilkinson SP & Grove A (2006) Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. *Curr Issues Mol Biol* **8**:51-62.

- Williams RM & Rimsky S (1997) Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein, H-NS: a central controller of gene regulatory networks. *FEMS Microbiol Lett* **156**:175-185.
- Wolf MK (1997) Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **10**:569-584.
- Wu RY, Zhang RG, Zagnitko O, *et al.* (2003) Crystal structure of *Enterococcus faecalis* SlyA-like transcriptional factor. *J Biol Chem* **278**:20240-20244.
- Wyborn NR, Clark A, Roberts RE, Jamieson SJ, Tzokov S, Bullough PA, Stillmann TJ, Artymiuk PJ, Galen JE, Zhao L, Levine MM & Green J (2004a) Properties of haemolysin E (HlyE) from a pathogenic *Escherichia coli* avian isolate and studies of HlyE export. *Microbiol* **150**: 1495-1505.
- Wyborn NR, Stapleton MR, Norte VA, Roberts RE, Grafton J & Green J (2004b) Regulation of *Escherichia coli* hemolysin E expression by H-NS and *Salmonella* SlyA. *J Bacteriol* **186**:1620-1628.
- Xue P, Corbett D, Goldrick M, Naylor C & Roberts IS (2009) Regulation of the Region 3 Promotor of the *Escherichia coli* K5 Capsule Gene Cluster Involves H-NS, SlyA and a Large 5' Untranslated Region. *J Bacteriol* **191**:1838-1846.
- Yamada M & Saier MH, Jr. (1988) Positive and negative regulators for glucitol (gut) operon expression in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **203**:569-583.
- Yona-Nadler C, Umanski T, Aizawa S, Friedberg D & Rosenshine I (2003) Integration host factor (IHF) mediates repression of flagella in enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology* **149**:877-884.
- Yoon H, McDermott JE, Porwollik S, McClelland M & Heffron F (2009) Coordinated regulation of virulence during systemic infection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS Pathogens* **5**: e1000306.
- Young GM, Badger JL & Miller VL (2000) Motility is required to initiate host cell invasion by *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **68**:4323-4326.
- Zhang W L, Kohler B, Oswald E, Beutin L, Karch H, Morabito S, Caprioli A, Suerbaum S & Schmidt H (2002) Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol* **40**:4486-4492.
- Zhang Z, Gosset G, Barabote R, Gonzalez CS, Cuevas WA & Saier MH (2005) Functional interactions between the carbon and iron utilization regulators, Crp and Fur, in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**:980-90.
- Zheng D, Constantinidou C, Hobman JL & Minchin SD (2004) Identification of the CRP regulon using in vitro and in vivo transcriptional profiling. *Nucleic Acids Res* **32**:5874-5893.
- Zhou L, Lei X, Bochner B & Wanner B (2003) Phenotype MicroArray Analysis of *Escherichia coli* K-12 Mutants with Deletions of All Two-Component Systems. *J Bacteriol* **185**:4956-4972.
- Zwir I, Shin D, Kato A, Nishino K, Latifi T, Solomon F, Hare JM, Huang H & Groisman EA (2005) Dissecting the PhoP regulatory network of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:2862-2867.



## 8. Lebenslauf

<b>PERSON</b>	geboren am 17. August 1977 in Berlin ledig deutsche Staatsangehörige
---------------	--

<b>ADRESSE</b>	Kruppstrasse 21 , 38126 Braunschweig
----------------	--------------------------------------

<b>MOBILTEL.</b>	0176 430 96 741
------------------	-----------------

<b>EMAIL</b>	Anna-KatharinaWagner@gmx.net
--------------	------------------------------

### BERUFSERFAHRUNG

#### **Vetter Pharma-Fertigung GmbH & Co. KG**

03/2010 - jetzt	Teamleiterin in der Abteilung Mikrobiologie
-----------------	---

#### **Vetter Pharma-Fertigung GmbH & Co. KG**

08/2008 - 03/2010	Stellvertretende Teamleiterin in der Abteilung Mikrobiologie
-------------------	--

#### **Technische Universität Carolo Wilhelmina, Braunschweig**

01/2006 - 03/2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin
-------------------	---------------------------------

#### **Robert Koch-Institut, Berlin**

01/2004 - 12/2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin
-------------------	---------------------------------

**STUDIUM**

**Freie Universität, Berlin  
Abteilung für Mikrobiologie**

- 04/2003 - 12/2003     Diplomarbeit "Molekular biologische Analysen des Transkriptions-Regulators SlyA in pathogenen und apathogenen *Escherichia coli*"
- 09/1997 - 04/2000     Vordiplom in Biologie

**SCHULBILDUNG**

**Beethoven-Gymnasium, Berlin**

- 05/1997     Abschluss Allgemeine Hochschulreife